



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
Carrera de Ingeniería Agronómica

TITULO:

“Caracterización taxonómico-funcional de hongos endófitos de raíces de *Cyrtochilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides* que se desarrollan en *Ocotea infrafoveolata* van der Werff y *Weinmannia fagaroides* Kunth”

***Trabajo de titulación previo a la obtención del título de
Ingeniera Agrónoma***

AUTORES:

Berneio Avendaño María Augusta
C.I. 0302476643

Heras Solís Priscila Estefanía
C.I.0105168645

DIRECTOR:

Blga. Denisse Fabiola Peña Tapia MsC
C.I. 0102501889

CUENCA-ECUADOR
13/11/2019



RESUMEN

La gran diversidad florística de los bosques andinos del sur del Ecuador, alberga especies endémicas de orquídeas epífitas, que se desarrollan en hospederos nativos, existiendo poca información ecológica sobre las relaciones interespecíficas que se establecen entre el hospedero, la orquídea huésped y los microorganismos asociados. Este trabajo presenta los resultados del estudio de las comunidades de hongos endófitos que colonizan las raíces de las orquídeas epífitas *Cyrtochilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides* al desarrollarse sobre los hospederos *Ocotea infrafoveolata* van der Werff y *Weinmannia fagaroides* Kunth. Reportamos además el aislamiento de hongos endófitos cultivables y su efecto en la germinación. Los resultados mostraron que las cepas aisladas *Umbelopsis* sp y *Trichoderma* sp, tienen un efecto promotor en la germinación de semillas de *C. gyriferum*, mientras que los hongos identificados como *Meyerozyma* sp, *Fusarium* sp, *Mucor* sp, *Sistotrema* sp e *Ilyonectria* sp promovieron la germinación de semillas de *E. amethystinoides*. Se evidencio además que la riqueza de la microbiota fúngica endófito presente en las raíces de *C. gyriferum* no se vio influenciada directamente por el forófito, mientras que los resultados en la composición de la comunidad fúngica de *E. amethystinoides* sugieren un posible efecto por parte del forófito.

Palabras claves: Hongo endófito. Interespecífico. Forófito. Riqueza. Microbiota.



ABSTRACT

The great floristic diversity of the Andean forests of southern Ecuador, hosts endemic species of epiphytic orchids, which develop in native hosts, with little ecological information on the interspecific relationships established between the forophyte, the host orchid and the associated microorganisms. This paper presents the results of the study of the endophytic fungal communities that colonize the roots of the epiphytic orchids *Cyrtorchilum gyriferum* and *Elleanthus amethystinoides* as they develop on the hosts *Ocotea infrafoveolata* van der Werff and *Weinmannia fagaroides* Kunth. We also report the isolation of cultivable endophytic fungi and their effect on germination. The results showed that the isolated strains *Umbelopsis* sp and *Trichoderma* sp, have a promoter effect on the germination of seeds of *C. gyriferum*, while the fungi identified as *Meyerozyma* sp, *Fusarium* sp, *Mucor* sp and *Ilyonectria* sp promoted the germination of seeds of *E. amethystinoides*. It was also evidenced that the richness of the endophytic fungal microbiota present in the roots of *C. gyriferum* was not directly influenced by the forophyte, while the results in the composition of the fungal community of *E. amethystinoides* suggest a possible effect on the part of the forophyte

Keywords: Endophyte. Interspecific fungus. Forophyte. Wealth. Microbiota.



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT.....	3
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE IMÁGENES	8
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.....	10
Cláusula de Propiedad Intelectual.....	11
Cláusula de Licencia y Autorización para Publicación en el Repositorio Institucional	13
AGRADECIMIENTOS	15
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	17
CAPITULO II: OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo general	19
2.2 Objetivos específicos	19
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS	20
3.1 Diversidad.....	20
3.2 Efecto fitoestimulante.....	20
CAPITULO IV: REVISIÓN DE LITERATURA	21
4.1 Riqueza y diversidad en los bosques andinos	21
4.2 Orquídeas endémicas del Ecuador	22
4.2.1 <i>Cyrtochilum gyriferum</i>	22
4.2.2 <i>Elleanthus amethystinoides</i>	22
4.3 Árboles nativos del sur del Ecuador	23
4.3.1 <i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	23
4.3.2 <i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff	24
4.4 Simbiosis entre organismos	24
4.5 Germinación de orquídeas	26
4.6 Propagación artificial de orquídeas	27
4.7 Riqueza de las comunidades	28
4.8 Técnicas moleculares	29



4.8.1 Reacción de Polimerización en Cadena (PCR)	29
4.8.2 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)	30
CAPITULO V: METODOLOGÍA	31
5.1 Área de estudio	31
5.2 Composición y diversidad	32
5.2.1 Recolección de raíces	32
5.2.1.1 Extracción de ADN	32
5.2.1.2 Reacción de Polimerización en Cadena (PCR)	33
5.2.2 Diversidad de las comunidades de hongos	34
5.2.2.1 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)	34
5.2.2.2 Determinación de la riqueza de las comunidades de hongos	36
5.2.2.3 Aislamiento y cultivo de hongos endófitos	36
5.3 Análisis molecular	37
5.3.1 Extracción de ADN	37
5.3.2 PCR	37
5.3.3 Caracterización molecular	39
5.4 Efecto fitoestimulante	39
5.4.1 Ensayo de germinación in vitro	39
5.5 Análisis estadístico	44
5.5.1 Diseño experimental.	44
5.5.2 Variables a analizar.	45
5.5.2.1 Efecto fitoestimulante	45
5.5.2.2 Diversidad y riqueza de hongos endófitos	45
CAPÍTULO VI: RESULTADOS	46
6.1 Composición y riqueza de las comunidades de hongos de <i>Cyrtorchilum gyriferum</i>	46
6.1.1 Composición de las comunidades de hongos de las raíces de <i>Cyrtorchilum gyriferum</i> y <i>Elleanthus amethystinoides</i> .	46
6.1.2 Riqueza de las comunidades de hongos de las raíces de <i>Cyrtorchilum gyriferum</i> .	47
6.1.3 Análisis de agrupamiento jerárquico de hongos asociados a las raíces de <i>Cyrtorchilum gyriferum</i> .	48
6.2 Identificación taxonómica de los hongos endófitos cultivables de raíces de <i>Cyrtorchilum gyriferum</i> al desarrollarse en dos diferentes forófitos (<i>O. infrafoveolata</i> y <i>W. fagaroides</i>)	50
6.3 Porcentaje de germinación de <i>Cyrtorchilum gyriferum</i>	51
6.3.1 <i>Cyrtorchilum gyriferum</i> que se desarrolla sobre el forófito <i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff.	51
6.3.2 Orquídea <i>Cyrtorchilum gyriferum</i> correspondiente al forófito <i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth.	52



6.4 Efecto fitoestimulante mediante ensayo de germinación de <i>Cyrtochilum gyriferum</i>	53
6.4.1 Germinación simbiótica de las semillas de <i>Cyrtochilum gyriferum</i> correspondiente al forófito <i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff a los 90 días.	53
6.4.2 Germinación simbiótica de las semillas de <i>Cyrtochilum gyriferum</i> correspondiente al forófito <i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff	55
6.4.3 Germinación simbiótica de las semillas de <i>Cyrtochilum gyriferum</i> correspondiente al forófito <i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth a los 90 días.	57
6.4.4 Germinación de las semillas de <i>Cyrtochilum gyriferum</i> correspondiente al forófito <i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	59
6.5 Riqueza de hongos endófitos de <i>Elleanthus amethystinoides</i> .	61
6.5.1 Riqueza de las comunidades de hongos de las raíces de <i>Elleanthus amethystinoid</i>	61
6.5.2 Análisis de agrupamiento jerárquico de hongos asociados a las raíces de <i>Elleanthus amethystinoides</i> .	62
6.6 Identificación taxonómica de los hongos endófitos cultivables de raíces de la orquídea <i>Elleanthus amethystinoides</i> al desarrollarse en dos diferentes forófitos (<i>Ocotea infrafoveolata</i> y <i>Weinmannia fagaroides</i>)	64
6.7 Porcentaje de germinación en semillas de <i>Elleanthus amethystinoides</i>	65
6.7.1 Orquídea <i>Elleanthus amethystinoides</i> correspondiente al forófito <i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff.	65
6.7.2 Orquídea <i>Elleanthus amethystinoides</i> correspondiente al forófito <i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth.	66
6.8 Efecto fitoestimulante mediante ensayo de germinación de <i>Elleanthus amethystinoides</i>	67
6.8.1 Germinación simbiótica de las semillas de <i>Elleanthus amethystinoides</i> correspondiente al forófito <i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff a los 90 días.	67
6.8.2 Germinación de las semillas de <i>Elleanthus amethystinoides</i> correspondiente al forófito <i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff	69
6.8.3 Germinación simbiótica de las semillas de <i>Elleanthus amethystinoides</i> correspondiente al forófito <i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth a los 90 días.	72
6.8.4 Germinación de las semillas de <i>Elleanthus amethystinoides</i> correspondiente al forófito <i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth.	74
CAPITULO VII: DISCUSIÓN	77
CAPITULO VIII: CONCLUSIONES	86
CAPITULO IX: RECOMENDACIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	90
ANEXOS	106



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Soluciones desnaturalizantes	34
Tabla 2 Estructura del ensayo de germinación por repetición de <i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff y <i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	42
Tabla 3 Estructura del ensayo de germinación por repetición de <i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff y <i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	42
Tabla 4 Riqueza de <i>Cyrtochilum gyriferum</i> respecto a los dos forófitos en estudio	47
Tabla 5 Cepas fúngicas identificadas molecularmente a nivel de género pertenecientes a raíces de la orquídea <i>Cyrtochilum gyriferum</i>	50
Tabla 6 Porcentaje total de germinación de las semillas de <i>Cyrtochilum gyriferum</i> correspondientes al forófito <i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff	53
Tabla 7 Porcentaje total de germinación de las semillas de <i>Cyrtochilum gyriferum</i> correspondientes al forófito <i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth.....	57
Tabla 8 Riqueza de <i>Elleanthus amethystinoides</i> respecto a sus dos forófitos estudiados.....	61
Tabla 9 Cepas identificadas molecularmente a nivel de género pertenecientes a la orquídea <i>Elleanthus amethystinoides</i>	64
Tabla 10 Porcentaje total de germinación de las semillas de <i>E. amethystinoides</i> sobre el forófito <i>O. infrafoveolata</i>	67
Tabla 11 Porcentaje total de germinación de las semillas de <i>Elleanthus amethystinoides</i> correspondientes al forófito <i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de las zonas de estudio donde se colectarán las raíces y semillas de las orquídeas para la investigación.....	31
Figura 2. Programa del termociclador aplicado en raíces para obtener la PCR.	33
Figura 3. Programa del termociclador aplicado en cepas de hongos para obtener la PCR.	38
Figura 4. Riqueza total de unidades taxonómicas operacionales (OTU) de la comunidad fúngica endófito de las orquídeas <i>Cyrtorchilum gyriferum</i> y <i>Elleanthus amethystinoides</i>	46
Figura 5. Dendograma de distancias de las bandas (OTUs fúngicos) obtenidas por cada forófito en la orquídea <i>Cyrtorchilum gyriferum</i>	48
Figura 6. Porcentaje de germinación para <i>Cyrtorchilum gyriferum</i> forófito <i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff.	51
Figura 7. Porcentaje de germinación para <i>Cyrtorchilum gyriferum</i> , usando cepas aisladas de raíces de plantas que se desarrollaban sobre el forófito <i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth.	52
Figura 8. Comportamiento de las semillas de <i>C. gyriferum</i> a los 90 días, correspondiente al forófito <i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff.....	55
Figura 9. Comportamiento de las semillas de <i>Cyrtorchilum gyriferum</i> a los 90 días, correspondiente al forófito <i>Weinmannia fagaroides</i> Kunt.....	59
Figura 10 Dendograma de distancias de <i>Elleanthus amethystinoides</i>	62
Figura 11. Porcentaje de germinación para <i>Elleanthus amethystinoides</i> usando cepas aisladas de raíces de plantas que se desarrollaban sobre el forófito <i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff.....	65
Figura 12. Porcentaje de germinación para <i>Elleanthus amethystinoides</i> forófito <i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth.....	66
Figura 13 Comportamiento de las semillas de <i>Elleanthus amethystinoides</i> a los 90 días, correspondiente al forófito <i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff	69
Figura 14. Comportamiento de las semillas de <i>Elleanthus amethystinoides</i> a los 90 días, correspondiente al forófito <i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth.	74

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Escala de germinación para semillas de orquídeas	43
Imagen 2. Gel de acrilamida para <i>C. gyriferum</i>	48
Imagen 3. Etapas de germinación alcanzados en semillas de <i>C. gyriferum</i> en el forófito <i>O. infraveolata</i>	56
Imagen 4 Gel de acrilamida para <i>E. amethystinoides</i>	62
Imagen 5. Etapas de germinación alcanzadas en semillas de <i>E. amethystinoides</i> en el forófito <i>O. infrafoveolata</i>	71
Imagen 6. Etapas de germinación alcanzados en semillas de <i>E. amethystinoides</i> en el forófito <i>W. fagaroides</i>	76
Imagen 8. Muestras de raíces congeladas a -80°C.	108



Imagen 9. Muestras de raíces para pruebas moleculares.	108
Imagen 10. Desinfección de raíces.	108
Imagen 11. Kit de extracción de ADN para raíces.	108
Imagen 12. Extracción de ADN de raíces.	109
Imagen 13. ADN de raíces.	109
Imagen 14. Cepas aisladas de <i>Cyrtochilum gyriferum</i> forófito <i>Ocotea infrafoveolata</i>	109
Imagen 15. Cepas aisladas de <i>Elleanthus amethystinoides</i> forófito <i>Ocotea infrafoveolata</i>	109
Imagen 16. Cepas aisladas de <i>Cyrtochilum gyriferum</i> forófito <i>Weinmannia fagaroides</i>	109
Imagen 17. Cepas aisladas de <i>Elleanthus amethystinoides</i> forófito <i>Weinmannia fagaroides</i>	109
Imagen 18. ADN extraído.	110
Imagen 19. Kit de extracción de ADN de hongos.	110
Imagen 20. Semillas de <i>Cyrtochilum gyriferum</i>	110
Imagen 21. Semillas de <i>Elleanthus amethystinoides</i>	110
Imagen 22. Semillas teñidas con Tetrazolio.	111
Imagen 23. Observación de semillas teñidas.	111
Imagen 24. Cloro preparado al 1% y 2%	111
Imagen 25. Semillas en Phytamax, Avena Agar, al 1% y 2% de cloro	111
Imagen 26. Medios de cultivo para la siembra.	112
Imagen 27. Materiales de siembra.	112
Imagen 28. Conteo de semillas de <i>C. gyriferum</i> y <i>E. amethystinoides</i>	112
Imagen 29. Cantidad de semillas por siembra de orquídea.	112
Imagen 30. Dispensión de medios más UV.	113
Imagen 31. Ensayo final de las orquídeas	113
Imagen 32. ADN de raíces.	113
Imagen 33. ADN de hongos.	113
Imagen 34. Preparación de alícuotas para PCR.	114
Imagen 35. Muestras para PCR en termociclador.	114
Imagen 36. Preparación de gel para cargar las muestras de PCR simples o anidadas.	114
Imagen 37. Corrida del gel para observar las bandas.	114
Imagen 38. Geles con gradiente desnaturalizante.	114
Imagen 39. Carga de muestras de PCR anidadas en el gel	114
Imagen 40. Corrida del gel por 17 horas.	114
Imagen 41. Bandas de ADN de hongos	115
Imagen 42. Bandas de ADN de raíces.	115



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

- PCR: Reacción de Polimerización en Cadena
- DGGE: Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante
- PDA: Agar Papa Dextroza
- FMI: Fungi Isolation Medium
- OTU: Unidades Taxonómicas Operacionales
- ITS: Espaciadores Internos Transcritos



Cláusula de Propiedad Intelectual

María Augusta Bermeo Avendaño, autora del trabajo de titulación "Caracterización taxonómico-funcional de hongos endófitos de raíces de *Cyrtochilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides* que se desarrollan en *Ocotea infrafoveolata* van der Werff y *Weinmannia fagaroides* Kunth", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 13 de noviembre de 2019.

María Augusta Bermeo Avendaño
C.I: 0302476643



Cláusula de Propiedad Intelectual

Priscila Estefanía Heras Solis, autora del trabajo de titulación “Caracterización taxonómico-funcional de hongos endófitos de raíces de *Cyrtochilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides* que se desarrollan en *Ocotea infrafoveolata* van der Werff y *Weinmannia fagaroides* Kunth”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 13 de noviembre de 2019.

Priscila Estefanía Heras Solis
C.I: 0105168645



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

María Augusta Bermeo Avendaño, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Caracterización taxonómico-funcional de hongos endófitos de raíces de *Cyrtochilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides* que se desarrollan en *Ocotea infrafoveolata* van der Werff y *Weinmannia fagaroides* Kunth”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 13 de noviembre de 2019.



María Augusta Bermeo Avendaño
C.I: 0302476643



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Priscila Estefanía Heras Solis en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Caracterización taxonómico-funcional de hongos endófitos de raíces de *Cyrtochilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides* que se desarrollan en *Ocotea infrafoveolata* van der Werff y *Weinmannia fagaroides* Kunth”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 13 de noviembre de 2019.

Priscila Estefanía Heras Solis
C.I: 0105168645



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres Marcelo y Narcisa, y a mis hermanos Chelo y Paty por el apoyo incondicional que me brindan, por su paciencia, constancia y amor. A mis abuelitos, mis tios/as, mis primos/as y a mis amigas Vale, Mayra, Magu y Gaby por ser un pilar en mi vida.

A Denisse por ser la mejor directora de tesis, por compartir sus conocimientos y su cariño, al Ing. Eduino Chica PhD por ayudarnos a sacar adelante este trabajo, de igual forma a Andrés Yarzabal PhD por su colaboración en el trabajo de laboratorio.

De una manera especial a Priscila por ser una amiga y compañera de tesis incondicional, paciente y muy dedicada, gracias por tu dedicación y por brindarme tu maravillosa amistad.

A todos los amigos que estuvieron presentes durante este proceso, gracias por su ayuda.



Agradezco a toda mi familia por brindarme su apoyo y estar pendientes constantemente; especialmente a Rocío.

A mi directora de tesis Blga. Denisse Peña, quien nos aportó mucho conocimiento, respondió cada duda y nos brindó la oportunidad de trabajar junto a ella, me llevo una gran experiencia. Al Ing. Eduardo Chica PhD, quien nos ayudó a la realización de esta tesis y nos aportó su conocimiento, gracias por su tiempo y paciencia. A Andrés Yarzabal PhD, quien nos aportó su conocimiento y nos colaboró en el trabajo de laboratorio.

A mi amiga y compañera de tesis María Augusta, gracias por la paciencia, por tu conocimiento y por las experiencias que hemos vivido. Gracias por todo este tiempo juntas.

A todas/os las/os amigas/os que hicieron posible esta tesis.



CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

Las orquídeas componen un grupo muy diverso y variado de especies, habiendo sido descritas hasta la actualidad alrededor de 25000 de ellas (Fischer, 2007; Freuler, 2008). En el Ecuador las orquídeas se encuentran localizadas en diferentes regiones y ecosistemas a lo largo del país. Uno de ellos son los bosques naturales en la región Andina que sufren un grave proceso de deforestación (Galeas *et al.*, 2010). La familia Orchidaceae actualmente presenta un alto grado de diversificación y especialización, seguramente debido a la relación simbiótica que establece con cierto grupo de hongos, generando una dependencia vitalicia con estos. (Waterman y Bidartondo 2008; Otero *et al.*, 2002; Zettler *et al.*, 2003).

Desde que se descubrió que la simbiosis entre organismos se daba en casi todas las especies, se han realizado estudios para entender cómo funciona este proceso natural, siendo las orquídeas un grupo de gran interés por las relaciones simbióticas que estas establecen con ciertos grupos de microorganismos, tales como hongos y bacterias (De Bary, 1879), los cuales son capaces de vivir en su hospedero sin causar daño aparente (Bayman y Otero, 2006) , estas relaciones pueden ser desde mutualismo hasta saprofitismo (Tao *et al* 2008). Los hongos que interactúan con las plantas forman relaciones mutualistas denominadas micorrizas, estas son vitales para la subsistencia y supervivencia de especies como las orquídeas (Bonfante y Anca, 2009), que al tener semillas diminutas y sin ninguna reserva de energía, requieren obligatoriamente de microorganismos que compensen ese déficit (Rasmussen H., 1995). Una herramienta que permite un conocimiento más profundo sobre este proceso natural es la germinación artificial o germinación simbiótica. Tal es el caso de las semillas de orquídeas terrestres de zonas templadas cuya propagación natural es extremadamente difícil (Arditti, 1992), por esta razón en muchas investigaciones se utilizan hongos simbióticos en los ensayos de germinación (Otero y Bayman, 2009, p.271).



Sin embargo, para que estos hongos simbióticos funcionen correctamente deben ser compatibles con las condiciones locales, incluidos los microbios ya existentes, aunque se tenga un escaso conocimiento sobre lo que la introducción de estos hongos pueda ocasionar en el ecosistema. (Agriculturers.com, 2018, p.1) Por ello se debe aprender de esta relación entre microorganismos y plantas para poder aprovechar esta simbiosis a nuestro beneficio. (Agriculturers.com, 2018, p.1)

El conocimiento de la identidad de los principales géneros de hongos que se asocian a las raíces de orquídeas, así como el entendimiento de su diversidad y especificidad en cuanto a la relación simbiótica que establecen con las orquídeas y sus hospederos son claves para su conservación (Maldonado, 2017).

Los usos de técnicas moleculares permiten en la actualidad la identificación de hongos, que facilitan la selección de cepas específicas permitiendo tener una mayor certeza al momento de realizar ensayos de germinación simbiótica.

La presente investigación se centró en el estudio de los agentes microbianos fúngicos endófitos en los distintos sistemas biológicos, se evaluaron aspectos taxonómicos y de diversidad mediante pruebas moleculares (PCR, DGGE), así como los beneficios que éstos hongos presentan en la germinación de dos especies de orquídeas andinas (Sánchez de Práger, 2001) destacándose así la importancia de la conservación de las plantas forófitas (Endara y Jost, 2011).



CAPITULO II: OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Caracterizar taxonómica y funcionalmente comunidades de hongos endófitos que colonizan raíces de *Cyrtochilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides* que se desarrollan sobre *Ocotea infrafoveolata* van der Werff y *Weinmannia fagaroides* Kunth.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la composición y los índices de diversidad de las comunidades de hongos que colonizan las raíces de *Cyrtochilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides*.
- Aislar los hongos cultivables asociados a las raíces de *Cyrtochilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides*.
- Caracterizar molecularmente hongos cultivables, asociados a las raíces de *Cyrtochilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides*.
- Evaluar el efecto fitoestimulante de hongos asociados a raíces de *Cyrtochilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides* sobre la germinación de sus semillas.



CAPÍTULO III: HIPÓTESIS

3.1 Diversidad.

H0.- No existe diferencia significativa entre la diversidad de hongos endófitos presentes en raíces de *Cyrtorchilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides* que se desarrollan sobre los forófitos *Ocotea infrafoveolata* van der Werff y *Weinmannia fagaroides* Kunth.

H1.- Existe diferencia significativa entre la diversidad de hongos endófitos presentes en raíces de *Cyrtorchilum gyriferum* *Elleanthus amethystinoides* que se desarrollan sobre los forófitos *Ocotea infrafoveolata* van der Werff y *Weinmannia fagaroides* Kunth.

3.2 Efecto fitoestimulante.

H0.- Ninguno de los hongos evaluados presentan efectos fitoestimulantes sobre la germinación de las semillas de las orquídeas *Cyrtorchilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides*.

H1.- Al menos uno de los hongos evaluados presenta efecto fitoestimulantes sobre la germinación de las semillas de las orquídeas *Cyrtorchilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides*.

CAPITULO IV: REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Riqueza y diversidad en los bosques andinos

Endara, L. y Jost, L (2011), mencionan que en Ecuador existen orquídeas endémicas en los pisos altitudinales comprendidos entre 0 y 4500 m.s.n.m, encontrando la mayor diversidad de orquídeas entre los 1000 y 3000 m.s.n.m con un pico entre 1500-2500 m de altitud, estas plantas están asociadas a los sistemas montañosos de la sierra, concentrándose la mayoría de orquídeas endémicas en los bosques montanos bajos y de neblina montanos.

Así también, según sus análisis, determinan que la mayor parte de las orquídeas endémicas se encuentran en las provincias de Morona Santiago (15%), Zamora Chinchipe (13%), Pichincha (10%), Napo (9%) y Loja (7%). Generalmente, la mayor diversidad de endémicas es aportada por los géneros *Lepanthes* (240 spp.), *Pleurothallis* (215 spp.), *Stelis* 223 spp., *Epidendrum* (205 spp.) y *Masdevallia* (151 spp.) (Endara, L. y Jost, L, 2011).

Se estima que 1455 especies poseen algún tipo de amenaza, el 2% se encuentran en “Peligro Crítico”, 11% en “Peligro” y la gran mayoría (87%) en estado “Vulnerable”. Únicamente 227 spp., que representan al 13%, se encuentran en alguna de las áreas protegidas (Endara, L. y Jost, L, 2011).

Las orquídeas están bien distribuidas a lo largo de climas tropicales y templados, con un número estimado de 25,000 especies (Dressler, 1993). Las orquídeas terrestres representan aproximadamente un tercio de todas las especies conocidas. Predominando en climas templados, además representan la forma de vida exclusiva en la que las orquídeas pueden prosperar en latitudes altas (Rasmussen, 2008).

4.2 Orquídeas endémicas del Ecuador

4.2.1 *Cyrtochilum gyriferum*

Es una hierba epífita, que se encuentra en el bosque andino alto entre los 2000-2500 m.s.n.m, hallada tres veces al sur del Ecuador y una ocasión en el nudo de Cajamarca, dentro del Parque Nacional Podocarpus y cerca de Sosoranga; registrándose así su distribución en la provincia de Loja. Es una especie restringida a los bosques interandinos del sur y es cultivada ex situ por Ecuagenera. Lamentablemente no tiene presencia en los herbarios ecuatorianos (Endara, L., Hirtz, A., y Jost, L., 2011b).

4.2.2 *Elleanthus amethystinoides*

Es una hierba terrestre o epífita, que se encuentra en el bosque andino bajo hasta el páramo entre los 1500-3500 m.s.n.m. hallada dentro del Parque Nacional Podocarpus, creciendo junto a la vegetación xerofítica, en claros naturales de los bosques y en carreteras, siendo así, ampliamente distribuida en el Ecuador en las provincias de Azuay, Cañar, Carchi, Loja, Napo y Pichincha. Está presente en los herbarios ecuatorianos de Loja (3), QCA (8), QCE (6). (Endara, L., Hirtz, A., y Jost, L., 2011a, p. 441)

Según Pangol, C y Tapay, W (2017), las orquídeas tanto *Cyrtochilum gyriferum* como *Elleanthus amethystinoides* se desarrollan también en los bosques de gañadel, pillachiquir, llaviuco, sobre árboles que pertenecen al grupo ecológico de las esciófitas teniendo un registro de estas plantas en sus sitios de colecta, siendo así, que éstos árboles se encuentran en bosques secundarios y bosques maduros. Dentro de su investigación destacan la presencia de estas dos especies de orquídeas epífitas en árboles como: *Weinmannia fagaroides*, *Hesperomeles ferruginea*, *Oreopanax avicennifolia*, *Ocotea infrafoveolata*, *Hedyosmun cumbalense*, *Cyathea caracasana*, *Hedyosmun racemosum* encontrando epífitas en todos los niveles de altura en éstos



árboles. Hernández (2000) menciona que la mayor riqueza de epífitas está asociada positivamente con la edad de sucesión del bosque.

4.3 Árboles nativos del sur del Ecuador

4.3.1 *Weinmannia fagaroides* Kunth

También conocido como “Sara” pertenece a la familia Cunoniaceae, de acuerdo a la descripción de Minga y Verdugo (2016) posee un hábito de crecimiento tipo árbol que puede llegar a una altura de 10 a 15 m y 30 cm de DAP; el fuste es recto, con una ramificación alterna, copa irregular y las “ramitas son teretes leñosas de color negro, sus hojas son compuestas, imparipinnadas de 2 a 5 cm de longitud con 9 a 16 folíolos” de forma ovada, “con el margen irregularmente crenado, ápice redondeado y base cuneada, su haz es verde lustroso de color gris” su envés es verde claro. Las flores de este árbol son de color blanco, pequeñas y bisexuales; se encuentran distribuidas en “racimos terminales simples fasciculados de 2 a 6 cm de largo, estos fascículos se encuentran compuestos por 2 a 5 flores pequeñas” cuyos pétalos son ovados, el cáliz posee 4 sépalos libres y los pedicelos tienen un largo de 3 mm. El androceo está compuesto por 10 estambres dispuestos en dos verticilos y su ovario es súpero con 4 lóculos. En cuanto a sus frutos son cápsulas oblongo-ovoides de 3 a 4 mm de largo, de color marrón cuando está madura y en los cuales podemos observar los estilos persistentes.

“Este árbol se encuentra distribuido en Costa Rica y Venezuela hasta Bolivia; ubicado en bosques húmedos, secos y subpáramos entre los 2000 y 3600 m s.n.m” (Harling, 1999, p.74).

En Ecuador, *Weinmannia fagaroides* Kunth es una especie muy abundante que se encuentra distribuida en los bosques altoandinos del sur, creciendo entre los 2700 y 3600 m s.n.m.; se encuentra en los bosques nativos de la cuenca del río Paute de forma dominante y en los bosques de ribera de los ríos de Cuenca donde su presencia es rara. Como características importantes

tenemos que conservan una excelente capacidad de rebrote, una buena regeneración natural y que su propagación es recomendada mediante semillas ya que germinan en un lapso de 60 a 70 días. (Minga y Verdugo, 2016, p.38)

“En cuanto a sus usos tradicionales, es empleado como materia prima para la construcción de casas pequeñas principalmente vigas y pilares, para uso medicinal, se usa en limpias y baños de dieta y también, las hojas sirven como forraje para el ganado” (Minga y Verdugo, 2016, p.38).

4.3.2 *Ocotea infrafoveolata* van der Werff

Es una especie de árbol poco conocida de entre las más de 20 especies del género *Ocotea*, siendo poco reportada, sin embargo, se conocen algunas características como su hábito de arbusto o árbol, corresponde a un estado nativo, se localiza en rangos altitudinales entre 2500-3000 m.s.n.m. y 3000-3500 m.s.n.m. en la región Andina, distribuida a lo largo de las provincias de Azuay, Carchi, Loja, Morona Santiago, Sucumbíos y Zamora Chinchipe (Tropicos.org, s. f.)

Perteneciente a la familia Laureaceae, forma parte de los bosques primarios y suelos volcánicos, se lo conoce además con el nombre de Yalte negro. Es un árbol de 20 metros de altura y 70-80 cm DAP, su corteza externa es negra a plomiza y la corteza interna tiene un color rosado claro. Tiene hojas ferrugíneas pubescentes con envés café-rojizo y un haz verde oscuro y de textura coriáceas. Las flores tienen un perianto verdoso-amarillento, su olor es similar al aguacate. Puede tener varios usos en la industria como tablas para carpintería, duelas, largueros, etc. (Plants.jstor.org, s. f.)

4.4 Simbiosis entre organismos

Kageyama et al (2008); Knapp et al (2012) mencionan que la palabra endófito es usada para mencionar a los microorganismos que viven sin causar daño dentro de un tejido vegetal.

Las orquídeas poseen semillas que en su mayoría necesitan de un hongo específico para germinar, mientras se forman sus hojas y raíces, siendo así que dependen de una función

simbiótica. También se menciona que, en el medio natural, el logro de esta relación es compleja y limitada, debido a que deben cumplirse ciertos factores de manera sincronizada, de tal manera que “el porcentaje de germinación de una semilla es muy bajo, lográndose así, que sólo 10 o 15 semillas germinen de un total de un millón y que solo una o dos lleguen a ser plantas adultas después de 2 o 3 años” (Menchaca, 2011, p.38-39). Determinándose así la importancia de utilizar adecuadamente las poblaciones silvestres de plantas, ya que pueden desaparecer sencillamente. (Menchaca, 2011, p.38-39)

De la misma manera tanto Menchaca, R.A (2011) como Salazar, S.A (2012) mencionan que las orquídeas pueden propagarse también a través de la germinación asimbiótica donde la semilla puede germinar y desarrollarse sin la presencia de un hongo ya que posee un medio simple que contiene minerales y azúcares, así como otros suplementos que le permiten su germinación y crecimiento.

Las raíces de las plantas forman una asociación simbiótica con ciertos hongos del suelo, a esta interacción se la conoce como micorriza, siendo la función principal de las micorrizas, ampliar el área de absorción de nutrientes de la planta hospedera mediante la exploración de mayor cantidad de suelo del que normalmente alcanzan las raíces. La distribución de los tipos de micorrizas existentes dependerá de la distribución de las plantas hospederas, condiciones climáticas y del suelo (Dighton, 2009).

En la naturaleza la mayoría de orquídeas durante sus primeras etapas de vida dependen de hongos, pues no todas las orquídeas son fotosintéticas y sus semillas carecen de reservas suficientes para su germinación, siendo los microorganismos fúngicos su fuente de carbono durante el crecimiento hasta la aparición de sus primeras hojas, esta estrategia nutricional se denomina mycoheterotrophy (Alghamdi, 2017).

El estudio de las micorrizas en especies de orquídeas es fundamental como primer enfoque para explicar no sólo la identidad de los hongos simbióticos y la propagación simbiótica de las plantas, sino también, para comprender el papel de la simbiosis como un potencial impulsor de la distribución geográfica de las especies, así como para averiguar si las especies de orquídeas simpátricas pueden compartir simbiontes de hongos en las primeras etapas de desarrollo (Bonnardeaux et al., 2007; Swarts, Sinclair, Francis, y Dixon, 2010).

Es cada vez más conocido que muchas orquídeas terrestres tienen una asociación micorrízica muy específica, que es una diferencia fundamental con respecto a las plantas en otras familias donde las plantas individuales se asocian con una gran diversidad de hongos (Brundrett, 2002).

Se puede esperar que las orquídeas que se asocian con un número limitado de hongos estén más predisuestas a estar en peligro, pues habría menos probabilidades de que sus semillas encuentren un hongo compatible para su germinación, al contrario de las que tienen una compatibilidad más amplia de hongos (Bonnardeaux et al., 2007).

4.5 Germinación de orquídeas

En la germinación de orquídeas, los embriones pasan a convertirse en plántulas. Dressler (1981) segmentó a las plántulas terrestres en dos tipos, siendo el primero especies donde las semillas se convierten rápidamente en fotosintéticas debido a que se encuentran en ambientes soleados y húmedos, lo que les permite crecer de manera más rápida a diferencia del segundo tipo que consta de especies donde las semillas no desarrollan clorofila durante varios meses o más, perteneciendo a este último grupo la mayoría de las orquídeas terrestres. A diferencia de las orquídeas epífitas que pueden convertirse en fotosintéticas en estados tempranos (Dressler, 1981).

Seaton y Ramsay (2005) mencionan que el proceso de germinación empieza con la imbibición tornándose de una coloración verde, originando una estructura llamada protocormo que luego se transformará en plántula.

Estas etapas fueron descritas mediante una adaptación hecha por Vasudevan y Staden (2010) la misma que fue implementada por Mariat (1952), Sternberg y Kane (1998) y Stewart y Zettler (2002) utilizada para clasificar la respuesta de germinación de las semillas desde la etapa 0 donde no existe germinación, hasta la etapa 5 donde existe la formación de hojas. En la escala antes mencionada, los estados del desarrollo embrionario constan de: 0 = semillas no germinadas, 1 = imbibición, 2 = germinación, 3 = Formación de protocormos, 4 = Desarrollo de rizoides, 5= Formación de hojas.

4.6 Propagación artificial de orquídeas

Las condiciones del crecimiento artificial de las orquídeas proporcionan una especificidad *in vitro* más amplia con los hongos a los que se asocia, al contrario de la especificidad *in situ*, Aún no se tiene claro si las orquídeas con mucha especificidad también forman relaciones a corto plazo con una gran diversidad de hongos *in situ*, ya que, es muy difícil medir la diversidad y los niveles de inóculo de hongos de orquídeas en los suelos, por lo que los experimentos *in vitro* siguen siendo el medio más eficaz para evaluar la compatibilidad entre orquídeas y hongos (Bonnardeaux et al., 2007).

Los métodos moleculares para la identificación de hongos micorrícicos son necesarios para determinar la diversidad de aquellos compatibles con las orquídeas. Sin embargo, la germinación simbiótica sigue siendo el único método práctico que permite conocer con exactitud la compatibilidad y especificidad entre hongos y orquídeas (Bonnardeaux et al., 2007).



4.7 Riqueza de las comunidades

La riqueza es una forma de medir el número de especies diferentes que componen una comunidad permitiendo enumerarlas e identificarlas. Los factores físicos como temperatura, lluvia y los cambios estacionales tienen influencia en la riqueza de las comunidades, aquellas cercanas a los polos suelen tener una riqueza menor, debido a las temperaturas más bajas y la menor cantidad de radiación solar que perciben, mientras las más cercanas al ecuador tienden a ser más ricas, pues reciben una gran cantidad de energía solar y por ende temperaturas más cálidas y lluvia abundante, además de estos factores existen muchos otros que también pueden influenciar en la riqueza de las comunidades (Khan Academy.org, 2019).

La riqueza de los endófitos en las diferentes especies puede verse afectada por varios factores tanto físicos como propios de los microorganismos, quienes buscan colonizar los diferentes tejidos, ciertos hongos producen fitoalexinas que inhiben el crecimiento de otros endófitos, evitando que estos formen parte colonizando los mismos tejidos (Schulz 2006).

Las condiciones climáticas y la especificidad del hospedero pueden influenciar en la riqueza de endófitos en orquídeas (Gamboa-Gaitán, 2006). Factores como el clima, tipo de suelo, geografía entre otros pueden tener efecto es así que, un sin número de factores como el clima, tipo de suelo, geografía, entre otros podrían influenciar en la presencia de hongos endófitos en orquídeas epífitas, en particular en bosques tropicales montanos (Salazar 2017). De manera específica, la distribución espacial de las epífitas vasculares sobre los forófitos depende de varios factores como la especie del forófito, su posición, edad, condición y/o de la presencia de otras epífitas (Hernández, 2000).

4.8 Técnicas moleculares

4.8.1 Reacción de Polimerización en Cadena (PCR)

Es una técnica de amplificación de ADN denominada reacción en cadena de la polimerasa que consiste en la amplificación *in vitro* de un fragmento de ADN específico. De tal manera que se trata de replicar una y otra vez un mismo fragmento de ADN, de forma similar a lo que hacen las células *in vivo* para replicar su ADN. Para esto debemos añadir un par de oligonucleótidos que actúen como cebadores para el ADN polimerasa (Mas, et al., 2001). La elección de estos oligonucleótidos (cebadores o primers) es crucial dado que han de delimitar la región a amplificar por lo que deben ser complementarios a cada uno de los extremos 3' de la región a amplificar. Además, se debe añadir 4 tipos de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) que componen el ADN (dATP, dGTP, dTTP y dCTP, en una mezcla equimolar de cada uno de ellos también conocida como Super Mix (Mas, et al., 2001). Por último, se debe agregar el ADN polimerasa la cual deber ser capaz de resistir elevadas temperaturas a la que somete al tubo de reacción. Estas son sometidas a ciclos de temperatura en un termociclador que nos permitirá la síntesis del ADN (Mas, et al., 2001).

Los ciclos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa consisten en tres etapas:

1. Desnaturalización que comprende temperaturas de 93°C a 97°C permitiendo la separación de la cadena de ADN en dos hebras. (Mas, et al., 2001).
2. Hibridación donde existe una bajada de temperatura de entre 50 – 65°C, lo que permite que los primers o cebadores se unan a la cadena de ADN amplificando las regiones deseadas. (Mas, et al., 2001).
3. Extensión permite determinar el tamaño de amplificación de la cadena, produciéndose una síntesis de la misma gracias a la enzima DNA polimerasa, a una temperatura que puede



variar de 70-72°C, que permite el ingreso de los desoxinucleótidos fosfato en la cadena. (Mas, et al., 2001).

4.8.2 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) “es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño, pero con diferente secuencia de nucleótidos” (Fernández y Le Borge, s.f, p.149). Se utilizan elementos químicos como la urea y formamida que desnaturalizan las cadenas de ADN, ubicadas en un gel de poliacrilamida las cuales actúan a una temperatura de 50-65°C. El ADN migra por el gel hasta encontrar su concentración desnaturalizante que depende de la secuencia de nucleótidos que posee la muestra. (Fernández y Le Borge, s.f, p.149).

CAPITULO V: METODOLOGÍA

5.1 Área de estudio

El área de estudio está ubicada en la región Sierra sur, dentro de la Zona de Planificación 6, en la provincia del Azuay, en los bosques secundarios de Llaviuco, Lluchicarrumi, Pillachiquir y Gañadel. De estos sectores se extrajeron muestras de raíces de las orquídeas *Cyrtochilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides*, que se desarrollan sobre árboles de las especies *Ocotea infrafoveolata* van der Werff y *Weinmannia fagaroides* Kunth. Los bosques de donde se colectaron las muestras de raíces, están en pisos climáticos similares desde los 3.152 m s.n.m. a 4.445 m s.n.m. (Ambiente.gob.ec, 2013)

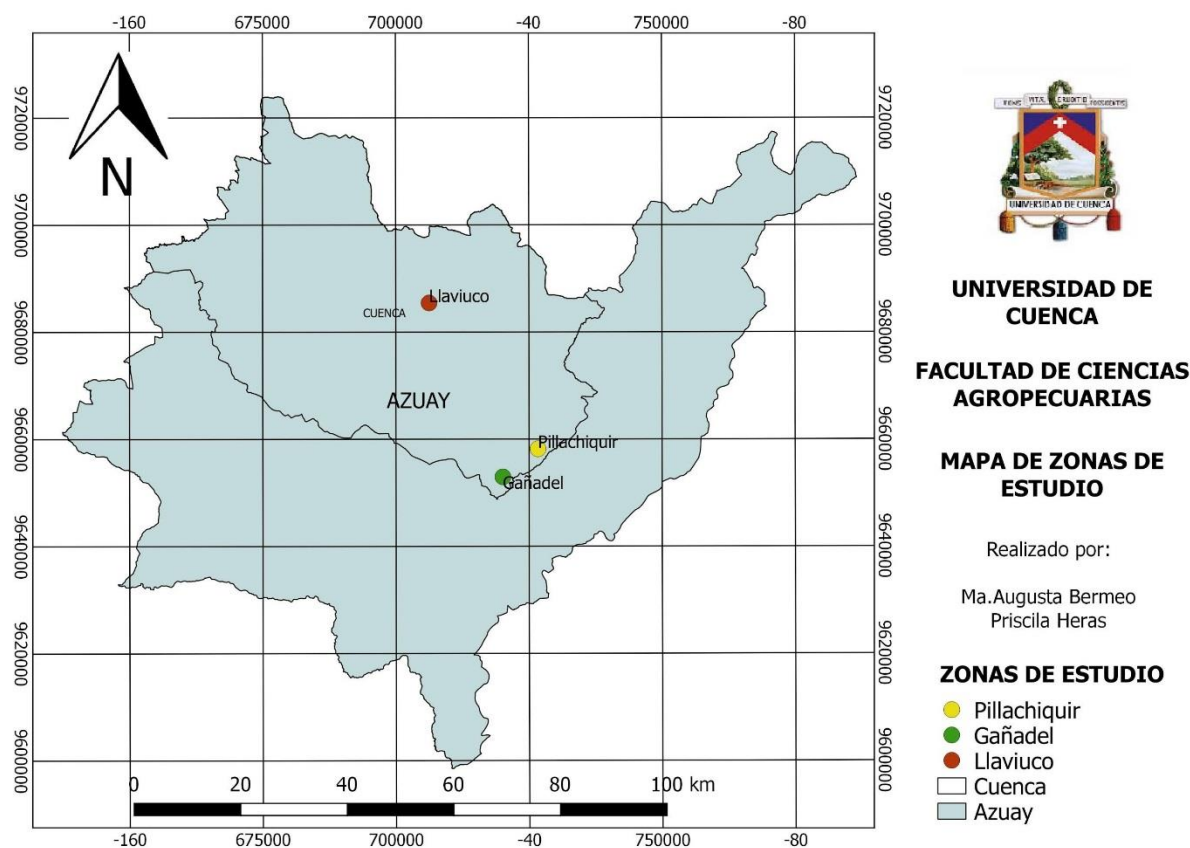


Figura 1. Mapa de las zonas de estudio donde se colectarán las raíces y semillas de las orquídeas para la investigación
Fuente: Sistema Nacional de Información.
Elaboración: Bermeo y Heras, 2018.

El proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Propagación in vitro de plantas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, mismo que cuenta con todos los equipos y espacio adecuado para el desarrollo de la investigación.

5.2 Composición y diversidad

5.2.1 Recolección de raíces

Se recolectaron las raíces de ambas orquídeas en 10 árboles de *Ocotea infrafoveolata* van der Werff (forófito 1), de los cuales 6 árboles correspondieron a *Cyrtochilum gyriferum* y 4 árboles a *Elleanthus amethystinoides*; para *Weinmannia fagaroides* Kunth (forófito 2) se tomaron muestras de 11 árboles, teniendo 7 árboles que corresponderían a *Cyrtochilum gyriferum* y 4 árboles a *Elleanthus amethystinoides*.

Estas muestras fueron trasladadas al laboratorio de propagación in vitro de plantas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, donde parte de las raíces de cada muestra fueron congeladas a -80°C . Los demás segmentos de raíz fueron lavados y procesados para el aislamiento de hongos endófitos.

5.2.1.1 Extracción de ADN

Para determinar la composición de la comunidad fúngica de las raíces de las orquídeas estudiadas se usaron las muestras que fueron congeladas a -80°C . Se lavaron los segmentos de raíz en agua corriente y luego se realizó la desinfección siguiendo el protocolo de Otero et al, 2002; que consiste en realizar lavados en etanol 75% (1min), cloruro de sodio (cloro) 2,5% (30seg), agua estéril (1min), etanol 75% (1min), agua estéril (1min). Mediante el Kit comercial PureLink® Plant Total DNA Purification Kit se extrajo el ADN total de las raíces. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (TAE 30ml, Agarosa 0,3 gr, Bromuro de Etidio 1μl) para comprobar la



5.2.1.2 Reacción de Polimerización en Cadena (PCR)

El programa usado en el Termociclador para obtener la PCR en las dos amplificaciones se describe a continuación: Desnaturalización 94°C, Hibridación 55°C, Elongación 72°C, Conservación a 10°C (Mas, et al., 2001)

Fases	1	2	3	4	5	6	7
Temperatura	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	10°C	
Tiempo	5 min	1 min	1 min	1 min	5 min	II	END
Ciclos	X 35						

Fuente: Bermeo y Heras, 2019

5.2.2 Diversidad de las comunidades de hongos

5.2.2.1 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

Para evaluar la diversidad de hongos en cada una de las muestras colectadas, los amplicones (productos de la PCR anidada) se migraron en un Gel de Electroforesis con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).

Un día antes de realizar el DGGE se prepararon las soluciones desnaturalizantes (urea y formamida) al 20% y 35% y una concentración de acrilamida al al 8% para ambas. La Tabla 1 indica las cantidades de cada reactivo usado en la preparación de las soluciones desnaturalizantes al 20 y 30%

Tabla 1
Soluciones desnaturalizantes

Reactivos	Gradiente	
	20%	35%
Acrilamida 40%	10ml	10ml
TAE 50X	0,5ml	0,5ml
Formamida	4ml	7ml
Urea	4,2g	7,35g
Agua destilada	Aforar a 50ml	

Fuente: Bermeo y Heras, 2019

Además, se preparó 1,5 ml de solución de acrilamida al 0% como tapón de fondo para el gel de acrilamida, para ello se usaron 260 μ l de acrilamida 40%, 18 μ l de TAE 40X y 1,22 ml de agua destilada se mezcló por inversión, se agregaron 9 μ l de APS al 10% (Persulfato de Amonio) y 1,5 μ l de TEMED y se mezcló por inversión nuevamente. Finalmente se colocó el tapón y se selló con una capa de agua destilada, para mejorar la polimerización y obtener una superficie recta, se dejó polimerizar de 3-4 minutos, una vez polimerizado el tapón se retiró el agua con papel absorbente.

Se montó el equipo formador de gradiente y se colocó en un tubo falcon 15ml de solución desnaturalizante al 35%, 90 μ l de APS y 15 μ l de TEMED, se homogenizó por inversión y se cargo



en la jeringa del equipo hasta llegar a un volumen de 12,5ml. Se procedió de la misma forma para la concentración al 20%. Finalmente se colocó sobre el tapón de fondo y se añadió agua destilada para dejar polimerizar, este proceso se lo realizó en un tiempo máximo de 5 minutos, para evitar la polimerización del gel antes de que éste se encuentre en el equipo.

Una vez polimerizado el gel se retiró el agua con papel absorbente y se agregó 3ml de solución de acrilamida al 0% como stacking (cuya función es apilar las muestras antes que se desnaturalicen), se usaron 520µl de acrilamida 40%, 36µl de TAE 40X, 2,44 ml de agua destilada, 18µl de APS y 3µl de TEMED, se mezcló por inversión y se añadió en el gel, se colocó el peine suavemente y de forma diagonal, retirándolo luego de 30 minutos y se agregó una pequeña cantidad de agua destilada para mantener hidratado y en buenas condiciones el gel hasta que las muestras sean cargadas.

Para la electroforesis se ensambló el equipo DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad), y se colocaron 7 litros de buffer de corrida TAE 0,5X, dejándolo alcanzar la temperatura de 60°C y un voltaje de 80V por 10 minutos. Pasado este tiempo se montaron los geles en el equipo y se cargaron los marcadores, los que consistieron en un pool de aproximadamente 60µl de alícuotas de PCR anidadas más 12µl de Bluejuice 6X, posterior se cargaron aproximadamente 15µl por muestra que contenía 3µl de Bluejuice 6X y $\pm 12\mu\text{l}$ del amplicón. Finalmente se colocó el TAE 0,5X hasta cubrir el gel y se lo dejó correr por 17 horas.

Para la tinción de las bandas se prepararon 3µl de SYBR Green 2X en 14µl de TAE 0,5X. Se tiñeron los geles cubriendo toda el área que contiene ADN con la solución de SYBR Green y se dejó actuar por 30 minutos en obscuridad. Se recuperó la solución de SYBR Green para el segundo gel y se realizó el mismo procedimiento. Una vez pasados los 30 minutos se colocó el gel en el fotodocumentador con un transiluminador molecular Imager® Gel Doc™XR+ Imaging System para su visualización y posterior análisis con la opción Faint_intense bands.

5.2.2.2 Determinación de la riqueza de las comunidades de hongos

El número de bandas comunes y únicas para cada especie de orquídea, consideradas como “unidades taxonómicas operacionales” (OTU), se usaron para evaluar la riqueza de hongos en ambas especies de orquídeas con respecto a sus forófitos, para el cual se tuvo en cuenta el número de bandas que resultó del análisis de Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE). Las imágenes que resultaron de este análisis fueron procesadas en el software PyElph 1.4 donde se obtuvo la riqueza y una matriz de distancias o dendograma de agrupamiento jerárquico para cada especie de orquídea respecto a su forófito para ello se usó el algoritmo UPGMA. La edición de la imagen de la matriz de distancias se realizó con el software Inkscape 0.92.

5.2.2.3 Aislamiento y cultivo de hongos endófitos

Se cortaron pequeños segmentos de raíces frescas y se los lavó en agua corriente, una vez limpias se las desinfectó siguiendo el protocolo usado por Maldonado (2017), que es una combinación de los protocolos de Zettler (1997) y Currah (1987) en el cual los segmentos de raíces se sumergieron por un minuto en una solución compuesta por cloro 2%, alcohol 70% y agua destilada estéril a una concentración 1:1:1, posterior fueron lavadas con agua destilada estéril. Una vez desinfectadas fueron llevadas a la cámara de flujo donde se realizó el cultivo de hongos



endófitos, se picó la raíz en trozos muy pequeños y se colocó medio FMI (Fungi Isolation Medium) sobre el picadillo, las placas Petri sembradas se mantuvieron a temperatura ambiente, pasadas 72-96 horas se revisaron las cajas en donde ya se notaba el crecimiento de pequeñas hifas de hongos, se los señaló y sembró individualmente en medio PDA (Agar Papa Dextrosa), se repicaron los hongos aislados hasta lograr que las cepas estén limpias y completamente puras. Las cepas fueron identificadas molecularmente y posterior guardadas en medio Avena Agar a -20°C para su conservación.

5.3 Análisis molecular

5.3.1 Extracción de ADN

Mediante el kit comercial PureLink genomic ® DNA se extrajo el ADN total de cada una de las cepas de hongos aislados (de las dos orquídeas en ambos forófitos), la calidad del ADN se verificó en gel de agarosa al 1%, para ello se migraron 4 μl de ADN +1 μl de tampón de carga comercial (Blue Juice). Una vez que las muestras se mezclaron en papel parafinado fueron cargadas en el gel de agarosa y se procedió a realizar la corrida a 100 V durante 20 minutos, finalmente, se observaron los resultados en el Software Image Lab 52.1 utilizando la aplicación de geles de ácido nucleico con bromuro de etidio a través del fotodocumentador Dcode Universal mutation detection system (Bio-Rad laboratories Ltd.) el mismo que nos permitió guardar las imágenes generadas de las muestras. El ADN se almaceno en tubos de 1,5 ml a -20°C .

5.3.2 PCR

Una vez obtenido el ADN total de cada una de las muestras de hongos, se procedió a realizar la amplificación de las regiones ITS del ADN a través de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los primers universales para eucariotas ITS1 e ITS4 (White et al, 1990). La amplificación se realizó en un termociclador Eppendor mastercycler® modelo nexus GSX1

programado para 45 ciclos. El perfil térmico que se utilizó se detalla a continuación: 5 min a 94°C desnaturalización inicial, seguido por 10 ciclos, cada uno de los cuales consistieron en 30 seg. a 94°C desnaturalización, 30 seg. a 65°C hibridación y 30 seg. a 72°C extensión, seguidos por 35 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 55°C, 30 seg. a 72°C, 7 min. a 72°C para elongación final y 10 °C para conservación. En los últimos 35 ciclos se usó un sistema Touchdown, aplicando la reducción de 1°C en cada ciclo.

Fases	1	2	3	4	5	6	7
Temperatura	94°C	94°C	65°C	72°C	94°C	55°C	72°C
Tiempo	5min	30seg	30 Seg	30seg	30seg	30seg	30seg
	D	D	H	E	D	H	E
Ciclos		X 10			X 35		

Fases	8	9	10
Temperatura	72°C	10° C	
Tiempo	7min	II	END
	E	Pausa	

Figura 3. Programa del termociclador aplicado en cepas de hongos para obtener la PCR.
Fuente: Bermeo y Heras, 2019

El producto de la amplificación se verificó en gel de agarosa 1%, posteriormente los amplicones (tubos de 1.5 ml) se sellaron con parafina y se enviaron para su secuenciación a la empresa Macrogen (Corea del Sur).

5.3.3 Caracterización molecular

Con las secuencias nucleotídicas obtenidas de las cepas de hongos, se realizaron asignaciones taxonómicas comparándolas con las secuencias nucleotídicas que se encuentran en las bases de datos del GenBank de la página NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para ello utilizamos el algoritmo megablast diseñado para identificar secuencias idénticas (100% de residuos idénticos) o muy parecidas (> 95% de residuos idénticos) entre las secuencias que se encuentran en la Web BLAST. Adicionalmente, una vez que se obtuvo la asignación taxonómica se complementó con la revisión bibliográfica y se seleccionaron las cepas de hongos que se reconocieron como hongos endófitos o micorrízicos de orquídeas.

5.4 Efecto fitoestimulante

5.4.1 Ensayo de germinación *in vitro*

Para las dos especies de orquídeas del estudio se utilizaron semillas conservadas en refrigeración en el Laboratorio de Propagación *in vitro* de plantas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. Se realizó la prueba de viabilidad a 3 muestras de semillas, de las cuales 1 muestra perteneció a *Cyrtochilum gyriferum* del Lote 1-Ecuagenera y 2 muestras a *Elleanthus amethystinoides* del Lote 2 R1 y Lote 3. La prueba consistió en tomar una pequeña cantidad de las semillas de las especies por separado y colocarlas en jeringas estériles de 5ml de capacidad, colocando previamente un pequeño segmento de algodón estéril en la base de la aguja para evitar la pérdida de las semillas durante el período de reposo. Agregamos cloro al 1% y dejamos actuar por 15 min agitándolas. Luego, enjuagamos con agua destilada estéril tres veces y dejamos las semillas en la jeringa por 24 horas con agua destilada estéril en la estufa a 30°C. Pasado ese periodo, eliminamos el agua y succionamos Tetrazolio al 1% y dejamos reposar por 24 horas. Finalmente, agregamos una gota de las semillas en suspensión sobre una caja Petri y procedimos



a observar en el Estereomicroscopio, tomando en cuenta que las semillas rojas son aquellas que se encuentran viables. Sin embargo, no se obtuvo ninguna tinción en las semillas por lo que se las dejó por 24 horas más en Tetrazolio al 1%; obteniendo como resultado que las semillas de *Cyrtochilum gyriferum* presentaron una coloración roja intensa y las semillas de *Elleanthus amethystinoides* una coloración roja intensa a muy intensa. Por lo consiguiente, se descartaron las semillas con una coloración pálida.

Posteriormente, se realizó un ensayo preliminar de desinfección en donde las semillas fueron desinfectadas en la cabina de flujo laminar, de la misma forma descrita anteriormente, pero esta vez usando hipoclorito de sodio al 1%, 2% y 3% más tween 20 (detergente). Las semillas se mantuvieron en agitación por 3 minutos y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Finalmente, se dejó en la jeringa agua destilada estéril con las semillas ya desinfectadas para facilitar la siembra. Se prepararon frascos con medio Phytamax y Avena Agar en los cuales se depositaron las semillas desinfectadas, teniendo así dos frascos por concentración de cloro (1%, 2% y 3%). Luego de la siembra, éstos se dejaron por una semana en el cuarto de crecimiento para observar posibles contaminaciones.

De las distintas concentraciones evaluadas, para la desinfección de semillas seleccionamos el Cloro al 2%, ya que presentó los mejores resultados para ambos medios de cultivo, debido a que en este tratamiento no existió contaminación.

Para la siembra se utilizaron aproximadamente 3.200 semillas de *Cyrtochilum gyriferum* equivalentes a 10 mg y 3.200 semillas de *Elleanthus amethystinoides* equivalentes a 3,2 mg. La unidad experimental del ensayo fue cada caja Petri.



La siembra de las semillas de las dos especies de orquídeas se realizó por separado. Con ayuda de la jeringa se colocó una a dos gotas de la suspensión de semillas desinfectadas en las cajas con medio avena agar (previamente elaborado y esterilizado), cabe destacar que, durante la desinfección y siembra se añadieron entre tres a cinco gotas del tween 20 en la jeringa que contenía semillas de *Elleanthus amethystinoides* para evitar que estas se adhieran a sus paredes.

Posteriormente, se inoculó 1 cm² de cada una de las cepas de hongos que se seleccionaron luego de la caracterización molecular. Utilizando un total de 18 cepas de hongos para la especie de orquídea *Cyrtochilum gyriferum* incluidos sus respectivos controles, de las cuales 10 cepas pertenecieron al forófito *Ocotea infrafoveolata* van der Werff y 8 cepas al forófito *Weinmannia fagaroides* Kunth; de la misma manera se procedió para la especie de orquídea *Elleanthus amethystinoides* en la cual se utilizaron 18 cepas de hongos con sus respectivos controles, perteneciendo así 8 cepas al forófito *Ocotea infrafoveolata* van der Werff y 10 cepas al forófito *Weinmannia fagaroides* Kunth. Los nombres de estas cepas de hongos podemos encontrarlas en Anexos 1 con sus respectivos códigos.

El ensayo de germinación se implementó en siete días, es decir se sembró una repetición por día, en cada repetición se sembró un control positivo (phytamax), un control negativo (avena agar) y el total de cepas identificadas como hongos endófitos-micorrízicos para cada especie de orquídea antes mencionada como se detallan en las Tablas 2 y 3. Se seleccionaron 18 cepas de hongos en total para cada especie de orquídea, dando como resultado un número de 20 cajas Petri por repetición para cada especie de orquídea. Teniendo un número total de 280 cajas Petri para todo el ensayo.

El ensayo presentó la siguiente estructura:

Tabla 2

Estructura del ensayo de germinación por repetición de Ocotea infrafoveolata van der Werff y Weinmannia fagaroides Kunth

<i>Cyrtochilum gyriferum</i>
Caja 1: semilla en medio avena agar sin cepa de hongo
Caja 2: semilla en medio Phytamax sin cepa de hongo
Caja 3: semilla en medio avena agar + cepa de hongo 1 (1 cm ²)
Caja 4: semilla en medio avena agar + cepa de hongo 2 (1 cm ²)
Caja n: semilla en medio avena agar + cepa de hongo n (1 cm ²)

Fuente: Bermeo y Heras, 2018.

Tabla 3

Estructura del ensayo de germinación por repetición de Ocotea infrafoveolata van der Werff y Weinmannia fagaroides Kunth

<i>Elleanthus amethystinoides</i>
Caja 1: semilla en medio avena agar sin cepa de hongo
Caja 2: semilla en medio Phytamax sin cepa de hongo
Caja 3: semilla en medio avena agar + cepa de hongo 1 (1 cm ²)
Caja 4: semilla en medio avena agar + cepa de hongo 2 (1 cm ²)
Caja n: semilla en medio avena agar + cepa de hongo n (1 cm ²)

Fuente: Bermeo y Heras, 2018.

Las cajas sembradas se mantuvieron en oscuridad dentro de fundas negras por cuatro semanas, tiempo en el cual se registraron los datos quincenalmente, pasado este tiempo las cajas se expusieron a un fotoperiodo programado de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad en el área de cultivo del laboratorio de Propagación *in vitro* de plantas por ocho semanas.

El estado de desarrollo de las semillas, se evaluó en base a los registros fotográficos quincenales, mediante los cuales se realizaron los análisis. Los datos que se tomaron en cada especie de orquídea, fueron los porcentajes de semillas en los diferentes estados de desarrollo en

relación a la escala adaptada por Vasudevan y Staden (2010) la misma que fue implementada por Mariat (1952), Sternberg y Kane (1998) y Stewart y Zettler (2002) utilizada para clasificar la respuesta de germinación de las semillas desde la etapa 0 donde no existe germinación, hasta la etapa 5 donde existe la formación de hojas luego de 12 semanas de la siembra en los diferentes tratamientos. En la escala antes mencionada, los estados del desarrollo embrionario son: 0 = semillas no germinadas, 1 = imbibición, 2 = germinación, 3 = Formación de protocormos, 4 = Desarrollo de rizoides, 5= Formación de hojas. Los resultados calculados fueron a) el porcentaje de semillas obtenidos en cada etapa; b) el porcentaje total de germinación.

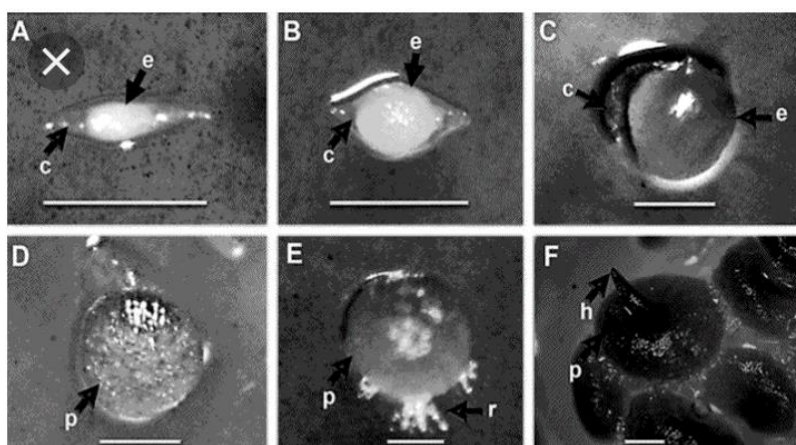


Figura 3. Etapas del desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis*. A) Etapa 0: Semillas no germinadas. (B) Etapa 1: Imbibición. (C) Etapa 2: Germinación (D) Etapa 3: Formación de protocormos (E) Etapa 4: Desarrollo de rizoides (F) Etapa 5: Formación de hojas. Escala de la barra = 1mm. c: cubierta de la semilla; e: embrión; h: hoja; p: protocormo; r: rizoides.

Imagen 1. Escala de germinación para semillas de orquídea adaptada por Vasudevan y Staden (2010) e implementada por Mariat (1952), Sternberg y Kane (1998) y Stewart y Zettler (2002)

Para el registro fotográfico se utilizó el software Scopelimage, para el análisis del registro fotográfico se realizó una base de datos en Excel con las distintas etapas de desarrollo y para el análisis estadístico se utilizó el Software libre InfoStat y Excel.

El análisis estadístico se realizó de acuerdo a la normalidad de los datos, usándose únicamente los datos del último registro fotográfico (6), los cuales fueron transformados a grados debido a la variación del número de semillas por caja Petri, con el fin de dar homogeneidad a los datos juntándolos en un escenario más pequeño y equitativo.

Las pruebas estadísticas que se realizaron fueron el análisis de varianza, Homogeneidad de la Varianza (prueba de Levene) y la prueba de normalidad de datos de Shapiro Wilks; sin embargo, los datos fueron no paramétricos por lo que se utilizó la prueba de Kruskal Wallis para su interpretación.

5.5 Análisis estadístico

5.5.1 Diseño experimental.

Los datos generados a partir de la caracterización molecular de las cepas se analizaron mediante el software PyElph 1.4. El análisis consistió en la obtención de la matriz de distancias genéticas que existieron entre las cepas a nivel de las secuencias de ADN.

Los dendogramas (análisis de agrupamiento jerárquico) para cada especie de orquídea respecto a su forófito se generaron con el uso del método UPGMA.

Se aplicó una estadística de comparación de secuencias, ya que se realizaron asignaciones taxonómicas con las secuencias nucleotídicas obtenidas de las cepas de hongos, comparándolas con las secuencias nucleotídicas que se encuentran en las bases de datos del GenBank de la página NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el algoritmo megablast diseñado para identificar secuencias idénticas (100% de residuos idénticos) o muy parecidas (> 95% de residuos idénticos) entre las secuencias que se encuentran en la Web BLAST a la secuencia problema (Juan, M., sf).

Para evaluar el efecto fitoestimulante de las cepas de hongos sobre las semillas de orquídea, se aplicó un diseño completamente al azar DCA con arreglo factorial, dos factores: a) hongos, b) estado de desarrollo germinativo de la semilla, por especie de orquídea y forófito. Los datos no presentaron normalidad por ello se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis al 5%.

Para el análisis de la influencia de los forófitos sobre la orquídea *Cyrtochilum gyriferum* se aplicó la prueba no paramétrica de Wilcoxon.

Para el análisis de la influencia del forófito sobre la orquídea *Elleanthus amethystinoides* se aplicó la prueba de T para muestras independientes.

5.5.2 Variables a analizar.

5.5.2.1 Efecto fitoestimulante

- Porcentaje de germinación de las semillas a los 90 días.
- Porcentaje de semillas en cada estado de desarrollo a los 0-15-30-45-60-75-90 días.

5.5.2.2 Diversidad y riqueza de hongos endófitos

- Número de bandas compartidas y no compartidas o unidades taxonómicas operacionales (OTU).

CAPÍTULO VI: RESULTADOS

6.1 Composición y riqueza de las comunidades de hongos de *Cyrtorchilum gyriferum*

6.1.1 Composición de las comunidades de hongos de las raíces de *Cyrtorchilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides*.

Mediante el análisis de riqueza se comprobó que la orquídea *Elleanthus amethystinoides* está compuesta por un número mayor de OTUs que *Cyrtorchilum gyriferum* sin embargo estas no son significativamente diferentes $p=0,0866$. Por lo cual la diferencia únicamente es visual, presentándose el siguiente histograma.

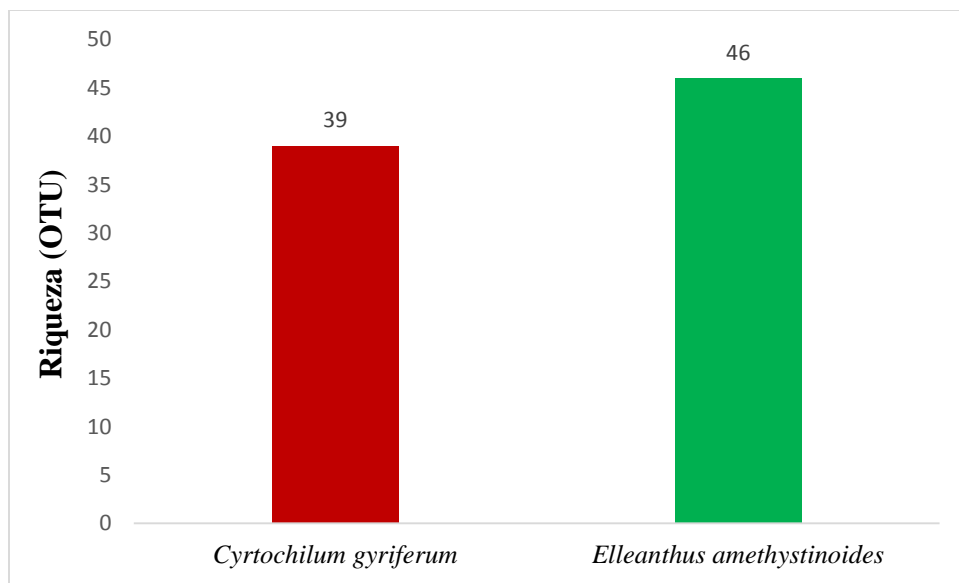


Figura 4. Riqueza total de unidades taxonómicas operacionales (OTU) de la comunidad fúngica endófito de las orquídeas *Cyrtorchilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides*.

Fuente: Bermeo y Heras, 2019

La figura 4 muestra la riqueza de OTUs por cada especie de orquídea, combinando los dos forófitos *O. infrafoveolata* y *W. Fagaroides*.

6.1.2 Riqueza de las comunidades de hongos de las raíces de *Cyrtochilum gyriferum*.

Mediante la aplicación de la prueba no paramétrica de Wilcoxon para el análisis de la influencia de los forófitos, se observó que no existieron diferencias significativas entre el número de bandas, $p > 0.9999$ para los forófitos.

Tabla 4

Riqueza de *Cyrtochilum gyriferum* respecto a los dos forófitos en estudio

Orquídea	Forófito	Bosque	Muestra	Riqueza
<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	<i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff	Gañadel	11	5
	<i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff	Gañadel	12	17
	<i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff	Gañadel	21	2
	<i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff	Gañadel	24	9
	<i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	Llaviuco	3	5
	<i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	Llaviuco	6	5
	<i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	Llaviuco	8	6
	<i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	Pillachiquir	16	16
	<i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	Gañadel (Campanarumi)	17	16
	<i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	Gañadel	25	1

Fuente: Bermeo y Heras, 2019

Las muestras colectadas del sector de Gañadel presentan mayor número de OTU comparadas con aquellas del sector de Llaviuco, no se observa una mayor influencia por parte de un forófito en específico sobre la riqueza de OTUs fúngicos en esta orquídea.

No se detectaron diferencias significativas que sustenten que el forófito sea el que condicione la riqueza de los hongos endófitos en la orquídea, pues la riqueza de los dos forófitos tienen valores medios similares de 8.25 para *O. infrafoveolata* y 8.16 para *W. fagaroides*.

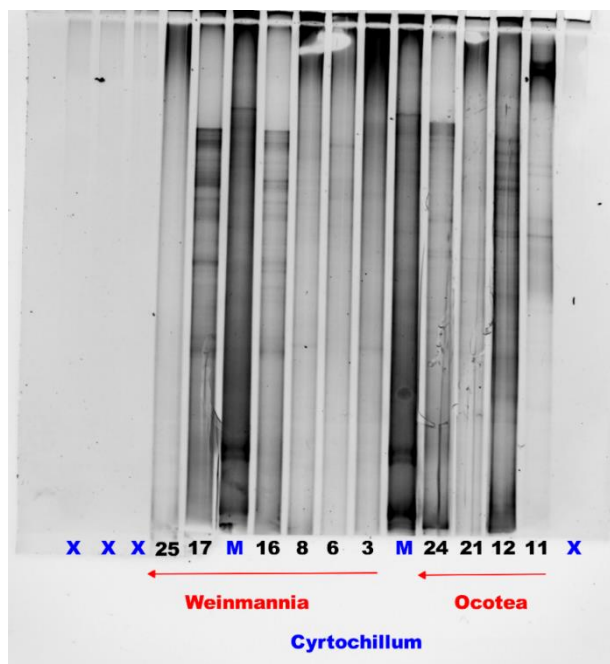


Imagen 2. Gel de acrilamida para *C. gyriferum*
Fuente: Bermeo y Heras, 2019

6.1.3 Análisis de agrupamiento jerárquico de hongos asociados a las raíces de *Cyrtochilum gyriferum*.

Cyrtochilum gyriferum

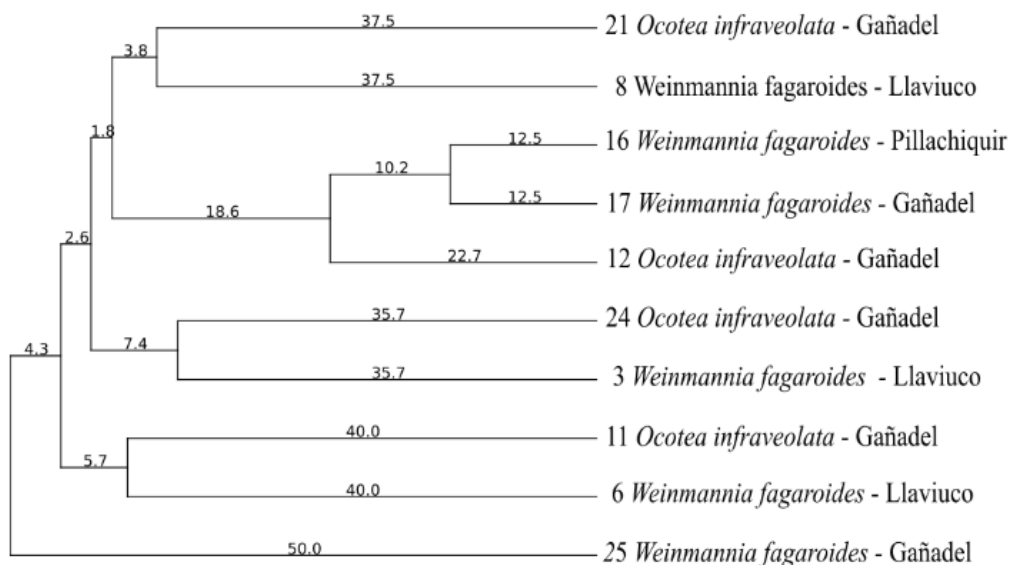


Figura 5. Dendrograma de distancias de las bandas (OTUs fúngicos) obtenidas por cada forófito en la orquídea *Cyrtochilum gyriferum*.

Fuente: Bermeo y Heras, 2019



Según el análisis del agrupamiento jerárquico de la figura 5, la estructura de las comunidades de hongos que colonizan las raíces de *C. gyriferum* no se establecen por una relación específica entre el forófito y la orquídea, formándose de manera independiente a las necesidades de cada planta, dándose así un agrupamiento aleatorio indistintamente del forófito.

Por otra parte, cabe recalcar que las muestras provienen de distintas zonas que presentan factores físicos y ecológicos similares, sin embargo, estos no influyen en el agrupamiento de las muestras según la similitud de sus comunidades; por lo que se desconoce si la altura, la temperatura, la humedad entre otras variables en las que este estudio no se centró, intervengan en la formación de la microbiota de las raíces.

6.2 Identificación taxonómica de los hongos endófitos cultivables de raíces de *Cyrtochilum gyriferum* al desarrollarse en dos diferentes forófitos (*O. infrafoveolata* y *W. fagaroides*)

Mediante el uso del algoritmo megablast y comparando las secuencias nucleotídicas de la base de datos del GenBank de la página

NCBI (National Center for Biotechnology Information) se identificaron a nivel de género las cepas endófitas presentadas a continuación.

Tabla 5

Cepas fúngicas identificadas molecularmente a nivel de género pertenecientes a raíces de la orquídea Cyrtochilum gyriferum

Código	Orquídea	Bosque	Forófito	Nombre Hongo	% Similitud	Característica
A4	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Umbelopsis</i>	94	Hongo No micorrícico endófito
A5	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Trichoderma</i>	88	Hongo endofito
A7	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Umbelopsis</i>	87	Hongo No micorrícico endófito
A8	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Umbelopsis</i>	98	Hongo No micorrícico endófito
A9	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Umbelopsis</i>	98	Hongo No micorrícico endófito
A10	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Umbelopsis</i>	79	Hongo No micorrícico endófito
A23	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Fusarium</i>	96	Hongo no micorrícico endófito
A24	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Umbelopsis</i>	95	Hongo No micorrícico endófito
A25	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Umbelopsis</i>	91	Hongo No micorrícico endófito
A26	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Nectria</i>	99	Hongo no micorrícico endófito
A27	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Fusarium</i>	99	Hongo no micorrícico endófito
A28	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Umbelopsis</i>	98	Hongo No micorrícico endófito
A30	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Armillaria</i>	81	Hongo no micorrícico endófito
A31	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Candida</i>	85	Hongo no micorrícico endófito
C1	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Pillachiquir	<i>Weinmannia fagaroides</i>	<i>Fusarium</i>	99	Hongo no micorrícico endófito
C2	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Gañadel	<i>Weinmannia fagaroides</i>	<i>Fusarium</i>	99	Hongo no micorrícico endófito
C3	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Llaviuco	<i>Weinmannia fagaroides</i>	<i>Absidia</i>	96	Hongo endófito
C5	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Campanarumi (Gañadel)	<i>Weinmannia fagaroides</i>	<i>Umbelopsis</i>	98	Hongo No micorrícico endófito
C6	<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	Llaviuco	<i>Weinmannia fagaroides</i>	<i>Fusarium</i>	99	Hongo no micorrícico endófito

Fuente: Bermeo y Heras, 2019.

6.3 Porcentaje de germinación de *Cyrtorchilum gyriferum*

6.3.1 *Cyrtorchilum gyriferum* que se desarrolla sobre el forófito *Ocotea infrafoveolata* van der Werff.

Para conocer si los diversos tratamientos empleados en el ensayo de germinación de esta orquídea presentaron efectos en la germinación se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis en la cual existieron diferencias significativas entre el promedio de los tratamientos, $H(14) = 65.24$, $p < 0.0001$, presentando dos rangos.

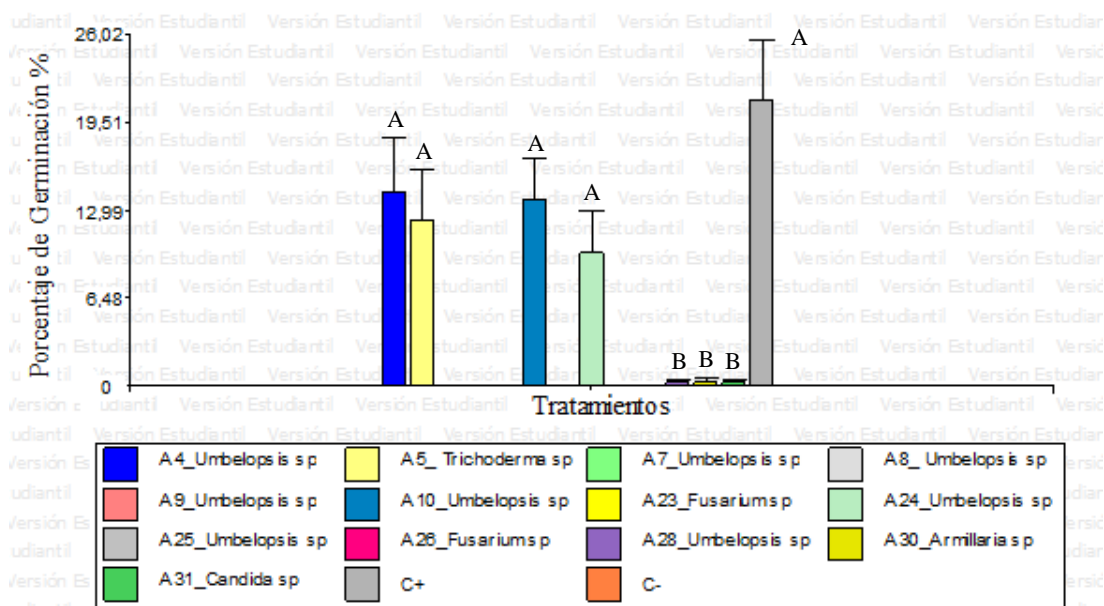


Figura 6. Porcentaje de germinación para *Cyrtorchilum gyriferum* forófito *Ocotea infrafoveolata* van der Werff.

Fuente: Bermeo y Heras, 2019.

Los tratamientos con cepas del género *Umbelopsis* (A4, A10, A24) y *Trichoderma* (A5) presentan resultados comparables con el control positivo en Phytamax, siendo eficaces promotores de la germinación, lo que sugiere una relación simbiótica entre éstas cepas y las semillas de *C. gyriferum*.

6.3.2 Orquídea *Cyrtochilum gyriferum* correspondiente al forófito *Weinmannia fagaroides* Kunth.

Mediante la aplicación de la prueba no paramétrica Kruskal Wallis para el análisis de los diversos tratamientos, obtuvimos que existieron diferencias significativas entre el promedio de los mismos, $H(6) = 20.26$ y $p < 0.0001$, presentando dos rangos.

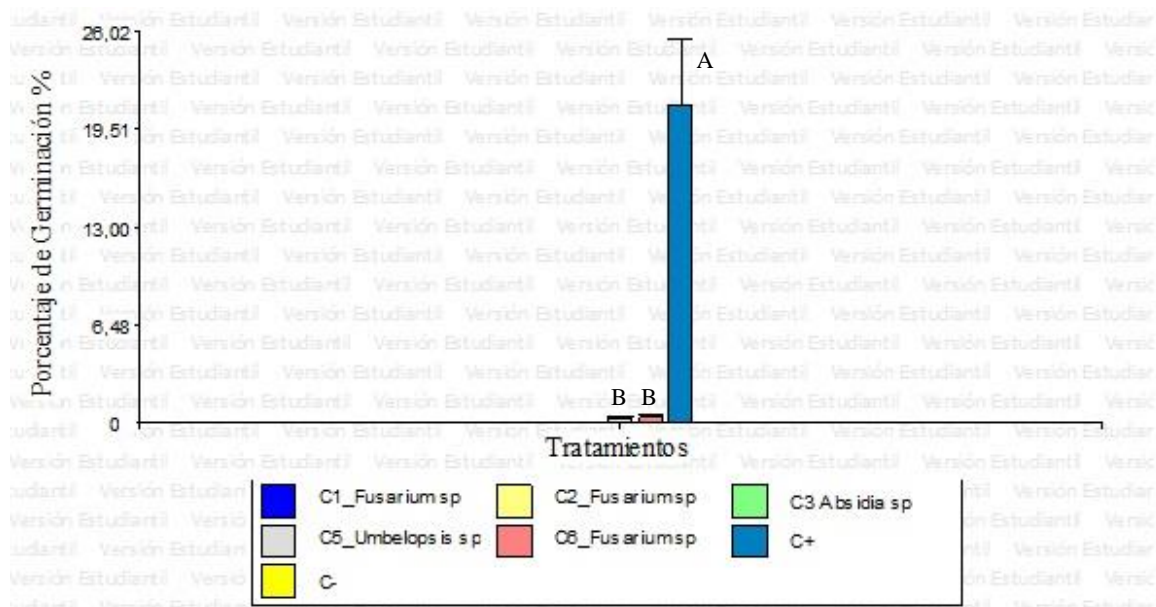


Figura 7. Porcentaje de germinación para *Cyrtochilum gyriferum*, usando cepas aisladas de raíces de plantas que se desarrollaban sobre el forófito *Weinmannia fagaroides* Kunth.
Fuente: Bermeo y Heras, 2019.

Los resultados obtenidos no evidencian un efecto promotor de la germinación por parte de ninguna de las cepas fúngicas evaluadas, pues la germinación se logró únicamente con el control en Phytamax.



6.4 Efecto fitoestimulante mediante ensayo de germinación de *Cyrtochilum gyriferum*

6.4.1 Germinación simbiótica de las semillas de *Cyrtochilum gyriferum* correspondiente al forófito *Ocotea infrafoveolata* van der Werff a los 90 días.

Tabla 6

Porcentaje total de germinación de las semillas de *Cyrtochilum gyriferum* correspondientes al forófito *Ocotea infrafoveolata* van der Werff

Especie de orquídea	Especie de árbol	Tratamientos	Total de semillas	Media de semillas por repetición	% Etapa 0 (Semillas no germinadas)	% Etapa 1 (Imbibición)	% Etapa 2 (Germinación)	% Etapa 3 (Formación de protocormo)	% Etapa 4 (Desarrollo de rizoides)	% Etapa 5 (Formación de hojas)	Total Germinación %
<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	<i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff	A4_ <i>Umbelopsis</i>	859	122,7	33,6±12,5	8,6±2,5	34,2±13,5	22±11,2	1,4±0,9	0,3±0,3	57,8±12,4
		A5_ <i>Trichoderma</i>	849	121,3	23,2±7,2	13,1±4	27,5±13,3	20,3±7,8	1,1±1,1	0,4±0,4	49,4±9,8
		A7_ <i>Umbelopsis</i>	1168	166,9	98,4±0,9	1,6±0,9	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
		A8_ <i>Umbelopsis</i>	1326	189,4	97,1±1,4	2,9±1,4	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
		A9_ <i>Umbelopsis</i>	1002	143,1	84,6±14,1	1,1±0,7	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
		A10_ <i>Umbelopsis</i>	1140	162,9	32,8±8,3	24,1±7,2	29,8±10,4	6,2±1,8	6,9±2,7	0,2±0,2	43,1±10,4
		A23_ <i>Fusarium</i>	1153	164,7	100±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
		A24_ <i>Umbelopsis</i>	670	95,7	37,8±12,3	12,4±4,3	16,8±8,7	15,5±7,4	3,2±1,9	0±0	35,5±11,7
		A25_ <i>Umbelopsis</i>	828	118,3	94,9±3,9	5,1±3,9	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
		A26_ <i>Fusarium</i>	1254	179,1	99,5±0,5	0,5±0,5	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
		A28_ <i>Umbelopsis</i>	1250	178,6	98,4±0,6	1,4±0,5	0±0	0,1±0,1	0±0	0±0	0,1±0,1
		A30_ <i>Armillaria</i>	1142	163,1	98,3±1,4	1,5±1,5	0,3±0,3	0±0	0±0	0±0	0,3±0,3
		A31_ <i>Candida</i>	1327	189,6	99,1±0,5	0,8±0,5	0,1±0,1	0±0	0±0	0±0	0,1±0,1
		Control positivo	920	131,4	11,4±3	0,4±0,3	0±0	2,5±1,6	38,2±10,6	47,5±9	88,2±3,1
		Control negativo	810	115,7	88,9±3,3	11,1±3,3	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Fuente: Bermeo y Heras, 2019. Se muestra el porcentaje de semillas germinadas encada etapa de desarrollo, además del porcentaje total de semillas que alcanzaron la germinación (E2= ruptura de la testa), cada valor se presenta con su correspondiente error estándar.

Se puede evidenciar en la tabla 6 que para *C. gyriferum*, en el forófito *O. infrafoveolata* los hongos que presentan mejores resultados como promotores de germinación fueron *Umbelopsis_A4*, *Trichoderma_A5*, *Umbelopsis_A10*, *Umbelopsis_A24*; teniendo el mayor porcentaje de germinación (57,8%) con la cepa *Umbelopsis_A4*. Mientras las demás cepas evaluadas muestran un efecto bajo y nulo como simbiontes promotores de la germinación de estas semillas.

6.4.2 Germinación simbiótica de las semillas de *Cyrtochilum gyriferum* correspondiente al forófito *Ocotea infrafoveolata* van der Werff.

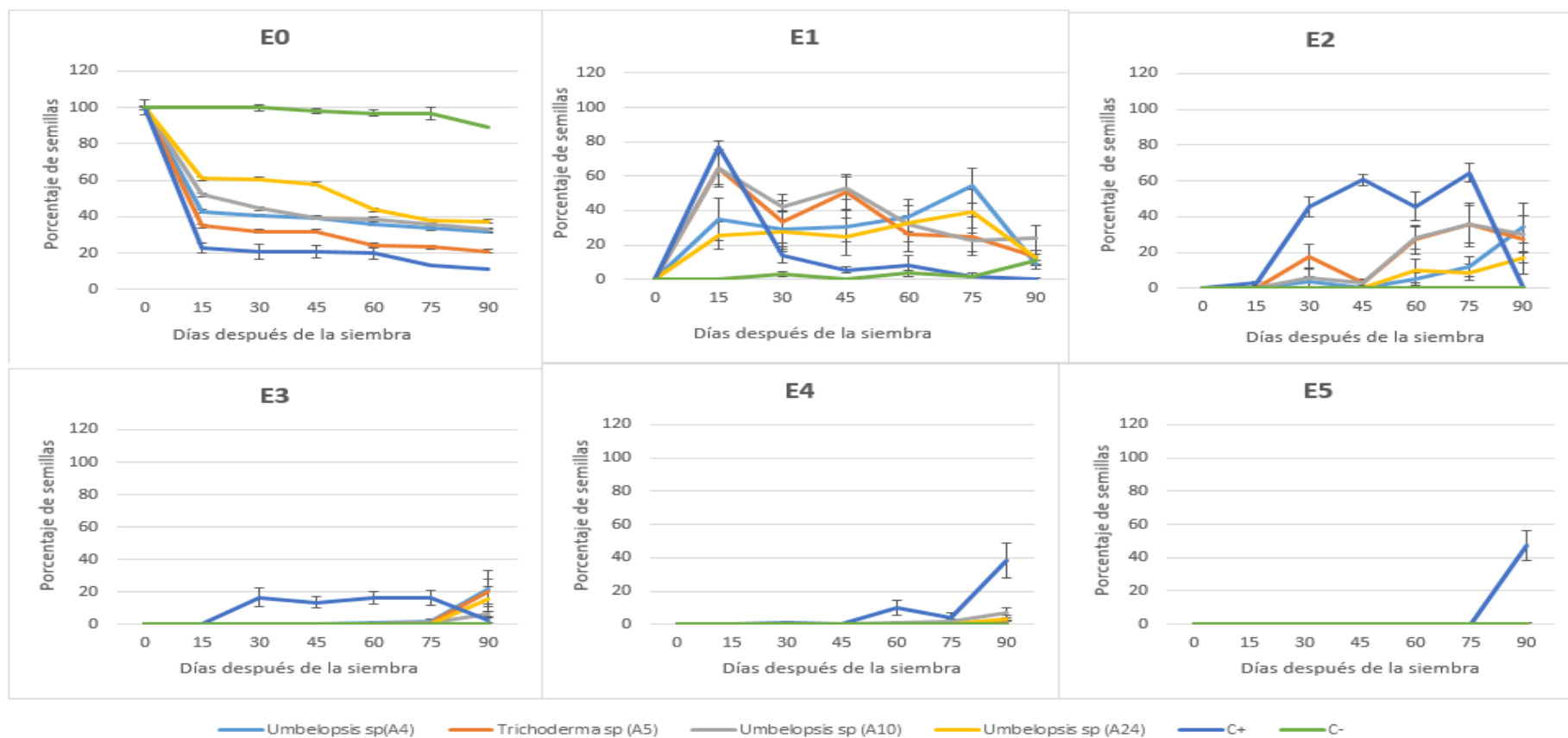


Figura 8. Comportamiento de las semillas de *C. gyriferum* a los 90 días, correspondiente al forófito *Ocotea infrafoveolata* van der Werff, durante las Etapas de germinación, E0: Semillas no germinadas, E1: Imbibición, E2: Germinación (ruptura de la testa), E3: Protocormo, E4: Aparición de rizoides, E5: Aparición de la primera hoja.

Fuente: Bermeo y Heras, 2019.

Se puede notar en la figura 8, en la etapa 0 todos los tratamientos muestran un comportamiento similar descendente en el porcentaje de semillas, llegando a ser muy baja la cantidad de semillas que se mantienen hidratadas (E0) a los 90 días, siendo A5_ *Trichoderma* la cepa con menor cantidad de semillas en esta etapa después del control en Phytamax. Durante la E1 y E2 se nota un comportamiento disparejo para cada cepa, observándose picos altos y bajos durante el tiempo, lo que significa que no existe un orden en el número de semillas que pasa a las siguientes etapas. La E3 denota que en los tratamientos las semillas llegan a esta etapa a los 75 días, a partir de lo cual empieza un comportamiento creciente en el número de semillas, durante la E4 la mayoría de los tratamientos alcanzan la formación de rizoides, pero a los 75 días y en poca cantidad, mientras el control positivo lo hace con gran cantidad de semillas, finalmente en la E5 solo el control positivo en Phytamax alcanza la aparición de la primera hoja.

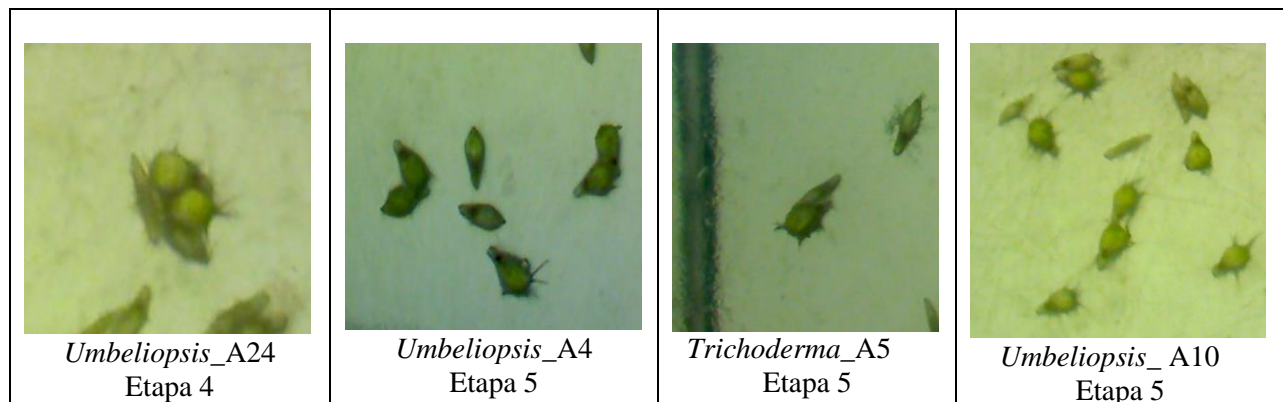


Imagen 3. Etapas de germinación alcanzados en semillas de *C. gyriferum* en el forófito *O. infraveolata*

Los tratamientos *Umbelopsis* A7, *Umbelopsis* A8, *Umbelopsis* A9, *Fusarium* A23, *Umbelopsis* A25, *Fusarium* A26, *Umbelopsis* A28, *Armillaria* A30, *Candida* A31, son cepas que también se usaron para el ensayo de germinación pero no mostraron algún resultado, considerándose que no existe efecto alguno como agente simbióticos para el desarrollo de las semillas de *C. gyriferum*, correspondientes al forófito *O. infrafoveolata*, por lo que no se ha visto necesario mostrar gráficos de sus resultados, ya que sus valores son nulos.

6.4.3 Germinación simbiótica de las semillas de *Cyrtochilum gyriferum* correspondiente al forófito *Weinmannia fagaroides* Kunth a los 90 días.

Tabla 7

Porcentaje total de germinación de las semillas de *Cyrtochilum gyriferum* correspondientes al forófito *Weinmannia fagaroides* Kunth

Especie de orquídea	Especie de árbol	Tratamientos	Total de semillas	Media de semillas por repetición	% Etapa 0 (Semillas no germinadas)	% Etapa 1 (Imbibición)	% Etapa 2 (Germinación)	% Etapa 3 (Formación de protocormo)	% Etapa 4 (Desarrollo de rizoides)	% Etapa 5 (Formación de hojas)	Total Germinación %
<i>Cyrtochilum gyriferum</i>	<i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	C1_ <i>Fusarium</i>	1071	153,0	96,4±2,2	3,6±2,2	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
		C2_ <i>Fusarium</i>	1156	165,1	96,5±1,6	3,5±1,6	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
		C3_ <i>Absidia</i>	1072	153,1	98,9±0,7	1,1±0,7	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
		C5_ <i>Umbelopsis</i>	1105	157,9	98,7±0,9	1,1±0,9	0,1±0,1	0±0	0±0	0±0	0,1±0,1
		C6_ <i>Fusarium</i>	995	142,1	97,6±1,3	2,1±1,2	0±0	0,3±0,3	0±0	0±0	0,3±0,3
		Control positivo	920	131,4	11,4±3	0,4±0,3	0±0	2,5±1,6	38,2±10,6	47,5±9	88,2±3,1
		Control negativo	810	115,7	88,9±3,3	11,1±3,3	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Fuente: Bermeo y Heras, 2019.

Se muestra el porcentaje de semillas para cada etapa de desarrollo, considerándose a partir de la E2 (ruptura de la testa) como el inicio de la germinación, cada valor se presenta con su correspondiente error estándar.

Las cepas evaluadas para la germinación de semillas de la especie *C. gyriferum* en el forófito *W. fagaroides*, no presentan resultados notables como promotores de germinación, únicamente *Umbelopsis_C5* alcanzó un 0,1% de semillas en la E2 de germinación y *Fusarium_C6* alcanzó un 0,3% de semillas en la E3, mientras las demás cepas lograron llegar de igual forma, en un porcentaje muy bajo, solamente a la E1. Esto contrasta con un 88,2% de germinación que se obtuvo en el tratamiento en Phytamax como control positivo.

6.4.4 Germinación de las semillas de *Cyrtochilum gyriferum* correspondiente al forófito *Weinmannia fagaroides* Kunth

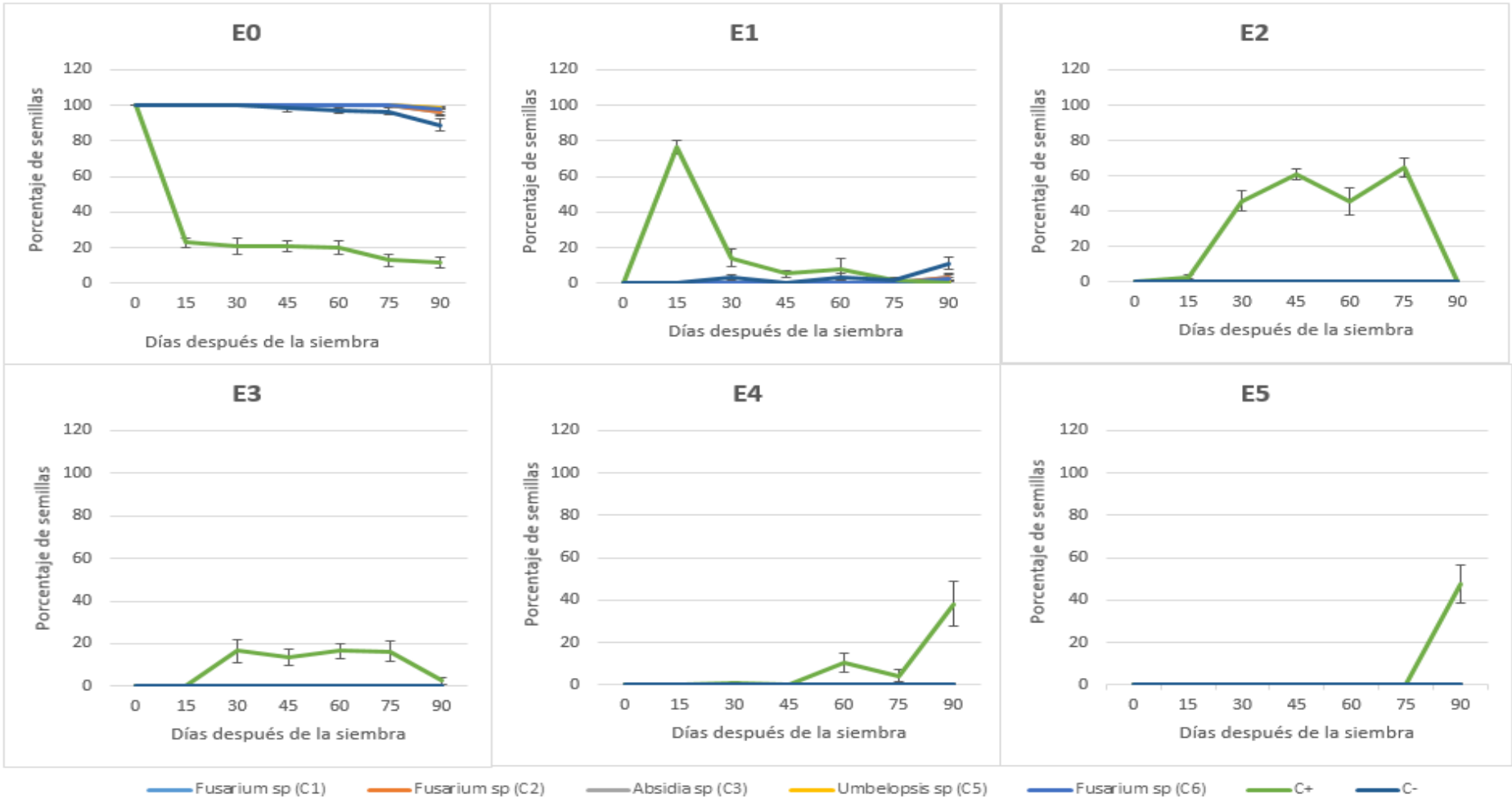


Figura 9. Comportamiento de las semillas de *Cyrtochilum gyriferum* a los 90 días, correspondiente al forófito *Weinmannia fagaroides* Kunt, durante las Etapas de germinación, E0: Semillas no germinadas, E1: Imbibición, E2: Germinación, E3: Protocormo, E4: Aparición E4: Aparición de rizoides, E5: Aparición de la primera hoja. Fuente: Bermeo y Heras, 2019.

En un panorama general según la figura 9, se nota que no existe mayor interacción entre hongos y semillas, no se observa un efecto estimulante en la germinación de las semillas, ya que las cepas evaluadas *Fusarium* (C6 y C2) apenas alcanzan un mínimo de cambio a la E1 (imbibición), y ninguna excepto el control positivo en Phytamax alcanza el máximo de desarrollo con un 47,5% en la E5.

6.5 Riqueza de hongos endófitos de *Elleanthus amethystinoides*.

6.5.1 Riqueza de las comunidades de hongos de las raíces de *Elleanthus amethystinoides*.

Para el análisis de la influencia del forófito sobre la orquídea *Elleanthus amethystinoides* se aplicó una prueba de T para muestras independientes con $p = 0.2288$.

Tabla 8

Riqueza de *Elleanthus amethystinoides* respecto a sus dos forófitos estudiados

Orquídea	Forófito	Bosque	# OTU o Muestra	Riqueza
<i>Elleanthus amethystinoides</i>	<i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff	Gañadel	14	25
	<i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff	Gañadel	20	3
	<i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff	Gañadel	22	12
	<i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff	Gañadel	23	6
	<i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff	Gañadel	26	9
	<i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	Llaviuco	4	13
	<i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	Llaviuco	5	17
	<i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	Llaviuco	9	17
	<i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	Gañadel (Campanarumi)	18	21

Fuente: Bermeo y Heras, 2019

Las muestras de raíces colectadas del forófito *Ocotea infrafoveolata* en el bosque de Gañadel presentaron un total de 55 OTU y un promedio de 11 a diferencia de las muestras del forófito *Weinmannia fagaroides* en el bosque Llaviuco las cuales obtuvieron un total de 68 OTU y un promedio de 17. Observando así que el forófito *Weinmannia fagaroides* presentó el mayor número de bandas, pudiendo influenciar en la riqueza total de la orquídea.

Las pruebas estadísticas evidencian una diferencia significativa entre la riqueza de hongos endófitos, en la orquídea *Elleanthus amethystinoides*. Cuando ésta se encuentra en los forófitos *Ocotea infrafoveolata* y *Weinmannia fagaroides*, lo que sugiere que la composición de la microbiota fúngica de *Elleanthus amethystinoides* podría estar influenciada por el árbol sobre el que se desarrolla, existiendo una relación entre forófito-orquídea-hongos endófitos.



Imagen 4 Gel de acrilamida para *E. amethystinoides*
Fuente: Bermeo y Heras, 2019

6.5.2 Análisis de agrupamiento jerárquico de hongos asociados a las raíces de *Elleanthus amethystinoides*.

Elleanthus amethystinoides

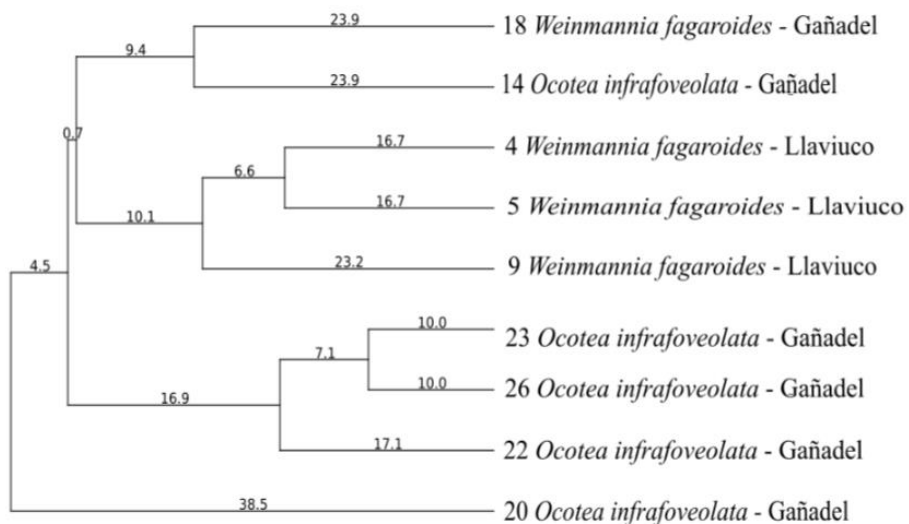


Figura 10 Dendrograma de distancias de *Elleanthus amethystinoides*
Fuente: Bermeo y Heras, 2019



Según la figura 10, el análisis de estructura de las comunidades de hongos de las raíces de *Elleanthus amethystinoides*, muestra un agrupamiento por especie de forófito y por zona de colecta, lo que sugiere que las características del forófito, el hábitat o la combinación de ambos factores podría influir en la composición de la comunidad de microorganismos fúngicos, ya que cada forófito así como cada zona de colecta tienen características propias que podrían influir en las asociaciones simbióticas hongo-raíz.

La falta de muestras de *Ocotea infrafoveolata* en el bosque de Llaviuco y de *Weinmannia fagaroides* en la zona de Gañadel, limitan la posibilidad de definir con claridad si la mayor influencia está dada por la especie o por características propias de la zona de colecta.

6.6 Identificación taxonómica de los hongos endófitos cultivables de raíces de la orquídea *Elleanthus amethystinoides* al desarrollarse en dos diferentes forófitos (*Ocotea infrafoveolata* y *Weinmannia fagaroides*)

Mediante el uso del algoritmo megablast y comparando las secuencias nucleotídicas de la base de datos del GenBank de la página

NCBI (National Center for Biotechnology Information) se identificaron a nivel de género las cepas endófitadas a continuación.

Tabla 9

Cepas identificadas molecularmente a nivel de género pertenecientes a la orquídea Elleanthus amethystinoides

Código	Orquídea	Bosque	Forófito	Nombre Hongo	% Similitud	Característica
A2	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Hypoxylon</i>	98	Hongo endófito
A12	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Umbelopsis</i>	88	Hongo No micorrícico endófito
A15	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Fusarium</i>	99	Hongo no micorrícico endófito
A16	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Epicoccum</i>	99	Hongo micorrícico endófito
A19	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Umbelopsis</i>	99	Hongo No micorrícico endófito
A20	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Ilyonectria</i>	99	Hongo endófito
A21	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Ilyonectria</i>	99	Hongo endófito
A22	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Gañadel	<i>Ocotea infrafoveolata</i>	<i>Ilyonectria</i>	99	Hongo endófito
E1	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Llaviuco	<i>Weinmannia fagaroides</i>	<i>Fusarium</i>	99	Hongo no micorrícico endófito
E2	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Llaviuco	<i>Weinmannia fagaroides</i>	<i>Fusarium</i>	97	Hongo no micorrícico endófito
E3	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Llaviuco	<i>Weinmannia fagaroides</i>	<i>Mucor</i>	100	Hongo endófito de orquídeas
E4	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Llaviuco	<i>Weinmannia fagaroides</i>	<i>Absidia</i>	97	Hongo endófito
E5	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Llaviuco	<i>Weinmannia fagaroides</i>	<i>Sistotrema</i>	87	Hongo micorrícico
E6	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Llaviuco	<i>Weinmannia fagaroides</i>	<i>Absidia</i>	81	Hongo endófito
E7	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Campanarumi (Gañadel)	<i>Weinmannia fagaroides</i>	<i>Fusarium</i>	99	Hongo no micorrícico endófito
P3	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Llaviuco	<i>Weinmannia fagaroides</i>	<i>Meyerozyma</i>	99	Hongos endófitos en orquídeas epífitas
P4	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Llaviuco	<i>Weinmannia fagaroides</i>	<i>Mucor</i>	99	Hongo endófito de orquídeas
P5	<i>Elleanthus amethystinoides</i>	Llaviuco	<i>Weinmannia fagaroides</i>	<i>Mucor</i>	99	Hongo endófito de orquídeas

Fuente: Bermeo y Heras, 2019.

6.7 Porcentaje de germinación en semillas de *Elleanthus amethystinoides*

6.7.1 Orquídea *Elleanthus amethystinoides* correspondiente al forófito *Ocotea infrafoveolata* van der Werff.

Al aplicar la prueba no paramétrica Kruskal Wallis para el análisis de los diversos tratamientos, obtuvimos que no existieron diferencias significativas entre el promedio de los mismos, $H(9) = 3.48$ y $p = 0.8974$.

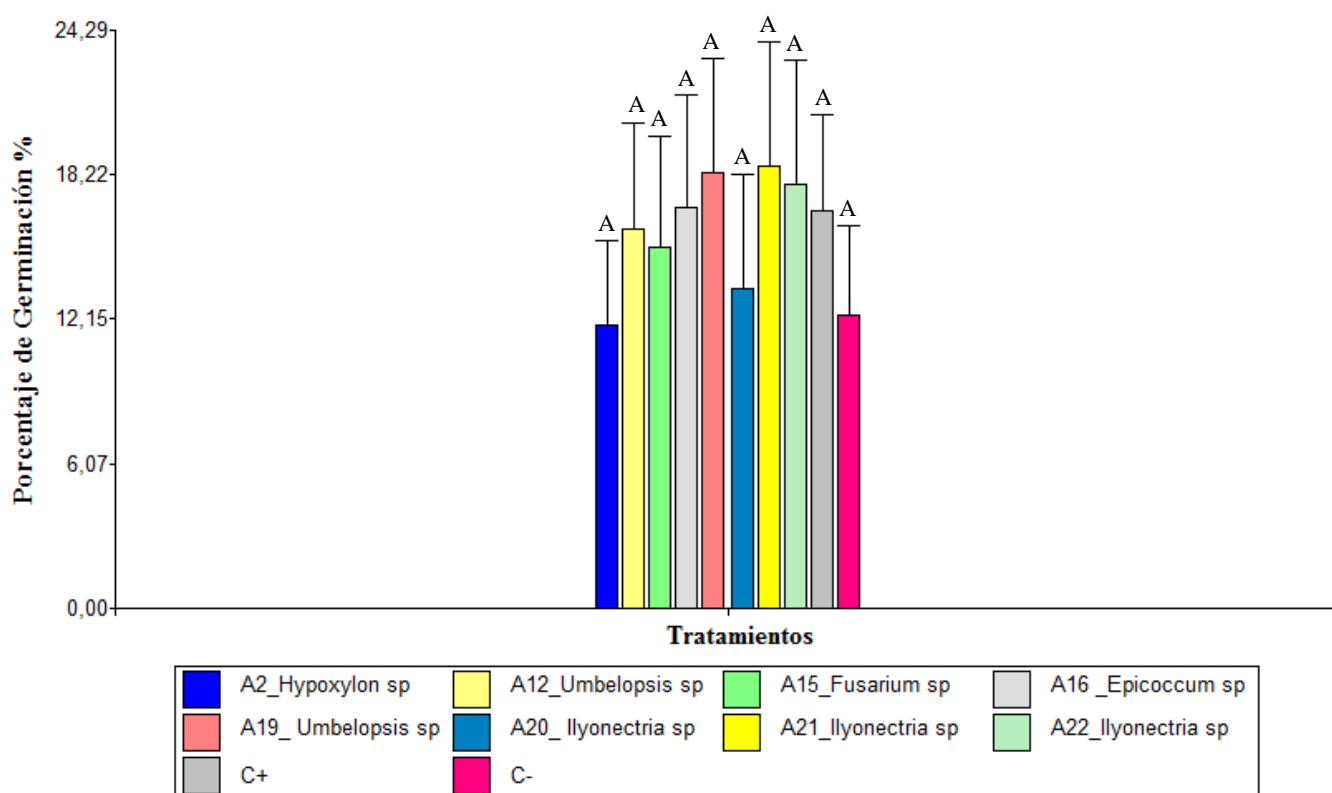


Figura 11. Porcentaje de germinación para *Elleanthus amethystinoides* usando cepas aisladas de raíces de plantas que se desarrollaban sobre el forófito *Ocotea infrafoveolata* van der Werff.

Fuente: Bermeo y Heras, 2019.

Los resultados no muestran diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Las diferencias que se observan en la figura 11 son únicamente debidas al azar.

6.7.2 Orquídea *Elleanthus amethystinoides* correspondiente al forófito *Weinmannia fagaroides* Kunth.

Para el análisis del porcentaje de germinación de los diversos tratamientos se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis, en la que no obtuvimos diferencias significativas entre el promedio de los mismos, $H(11) = 2.77$ y $p = 0.9855$.

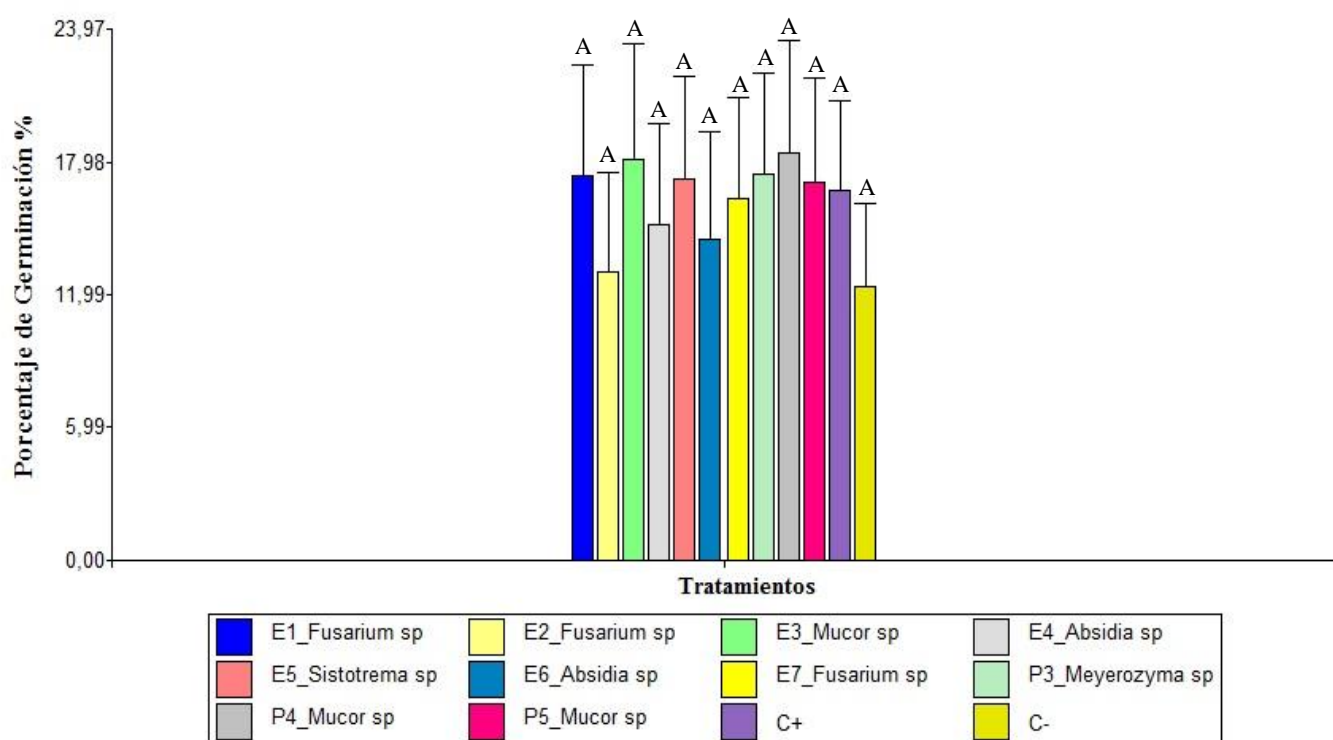


Figura 12. Porcentaje de germinación para *Elleanthus amethystinoides* forófito *Weinmannia fagaroides* Kunth
Fuente: Bermeo y Heras, 2019.

Los tratamientos evaluados no presentan diferencias estadísticas significativas. Las diferencias que se observan en la figura 12 son únicamente debidas al azar.

6.8 Efecto fitoestimulante mediante ensayo de germinación de *Elleanthus amethystinoides*

6.8.1 Germinación simbiótica de las semillas de *Elleanthus amethystinoides* correspondiente al forófito *Ocotea infrafoveolata* van der Werff a los 90 días.

Tabla 10

Porcentaje total de germinación de las semillas de *E. amethystinoides* sobre el forófito *O. infrafoveolata*

Especie orquídea	Especie de árbol	Tratamientos	Total de Semillas	Media de semillas por repetición	% Etapa 0	% Etapa 1 (Imbibición)	% Etapa 2 (Germinación)	% Etapa 3 (Formación de protocormo)	% Etapa 4 (Desarrollo de rizoides)	% Etapa 5 (Formación de hojas)	Total % de germinación
<i>Elleanthus amethystinoides</i>	<i>Ocotea infrafoveolata</i> van der Werff	<i>Hypoxylon</i> (A2)	810	115.7	1.96±1.51	51.34±12.6	37.3±10.92	9.4±5.11	0±0g	0±0	46.7±12.06
		<i>Umbelopsis</i> (A12)	721	103.0	1.28±0.95	31.65±7.75	62.8±8.58	4.27±1.22	0±0	0±0	67.07±8.21
		<i>Fusarium</i> (A15)	818	116.9	0.42±0.31	34.2±11.36	60.15±12.46	5.24±3.76	0±0	0±0	65.38±11.38
		<i>Epicoccum</i> (A16)	808	115.4	4.09±3.6	23.76±5.75	68.26±8.95	3.89±1.02	0±0	0±0	72.15±8.36
		<i>Umbelopsis</i> (A19)	736	105.1	0.53±0.53	20.78±4.8	72.28±6.27	6.41±2.14	0±0	0±0	78.69±4.89
		<i>Ilyonectria</i> (A20)	705	100.7	0.65±0.43	36.96±12.14	61.07±11.99	1.32±1.18	0±0	0±0	62.39±12.21
		<i>Ilyonectria</i> (A21)	898	128.3	0.15±0.15	17.44±6.14	78.22±6.34	4.19±1.12	0±0	0±0	82.4±6.13
		<i>Ilyonectria</i> (A22)	779	111.3	0.24±0.24	17.22±5.37	79.52±4.41	3.02±1.4	0±0	0±0	82.54±5.39
		Control negativo	740	105.7	0.74±0.49	50.02±8.9	45.07±9.71	0.17±0.14	0±0	0±0	45.24±9.65
		Control positivo	755	107.9	0±0	32.95±6.28	50.6±10.02	13.06±7.38	2.48±2.48	0.62±0.62	66.77±6.45

Fuente: Bermeo y Heras, 2019.

Porcentaje medio acumulativo de la germinación de semillas de *E. amethystinoides* en los tratamientos fúngicos a los 90 días. Considerando a la E2=ruptura de la testa como inicio de la germinación. Los datos se expresan en medias ± error estándar.

En la Tabla 12 observamos los distintos tratamientos simbióticos y los controles utilizados en el ensayo de germinación de las semillas de *E. amethystinoides* para el forófito *Ocotea infrafoveolata* van der Werff. Los datos en porcentajes se expresan en medias \pm error estándar para las distintas etapas de crecimiento de las semillas, las cuales permitieron evaluar el porcentaje total expresado en medias de la germinación, considerada como la etapa 2, la cual consiste en la ruptura total de la testa. Como se puede observar en la tabla 10, el mayor porcentaje de germinación por encima del C+(Phytamax) lo obtuvieron los tratamientos de *Ilyonectria* (A21, A22), seguido de *Umbelopsis* (A19) y *Epicoccum* (A16) lo que sugiere un posible rol simbiótico promotor de la germinación en estas semillas.

6.8.2 Germinación de las semillas de *Elleanthus amethystinoides* correspondiente al forófito *Ocotea infrafoveolata* van der Werff

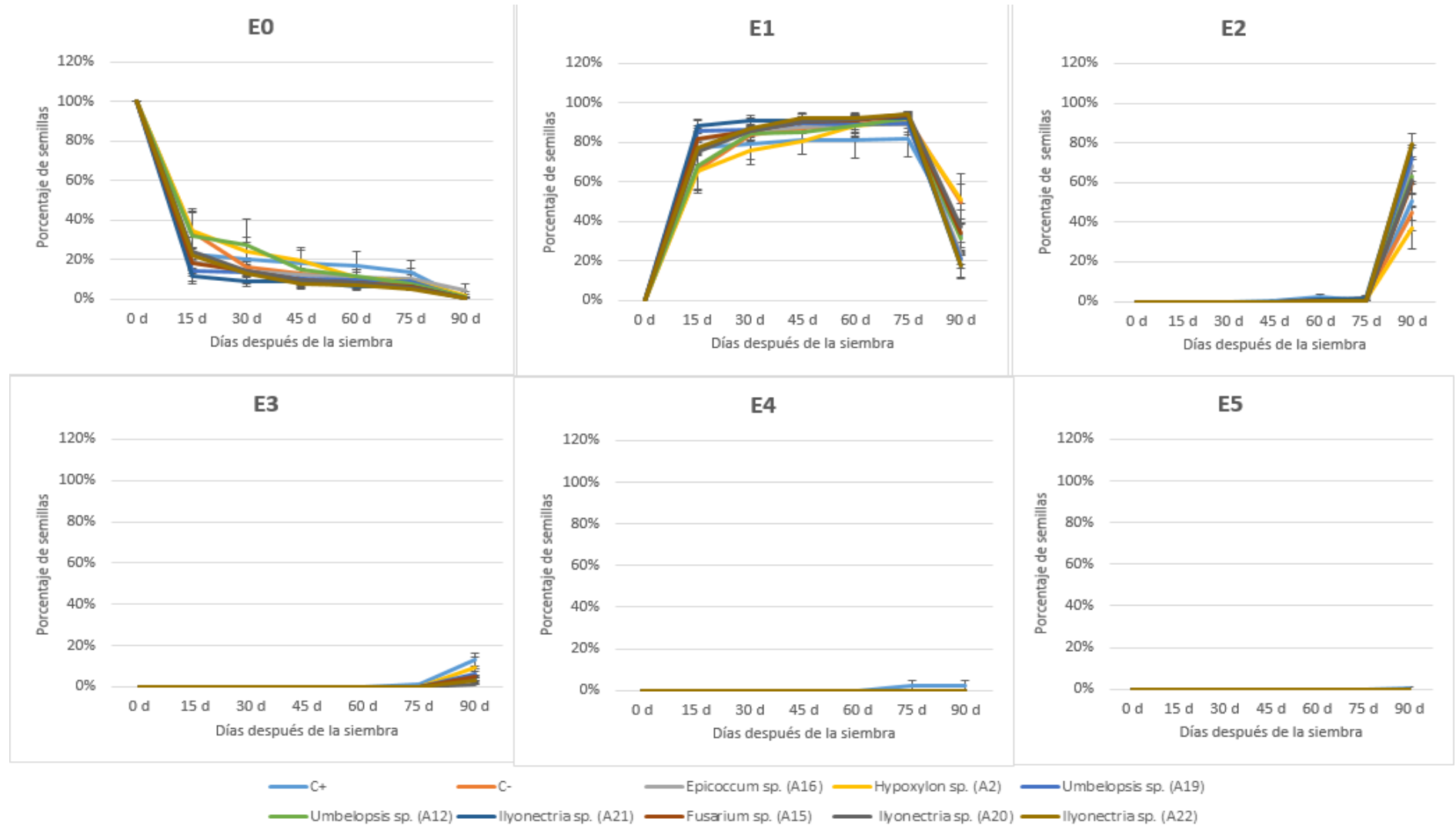


Figura 13 Comportamiento de las semillas de *Elleanthus amethystinoides* a los 90 días, correspondiente al forófito *Ocotea infrafoveolata* van der Werff, durante las etapas de germinación E0: Semillas no germinadas, E1: Imbibición, E2: Germinación (ruptura de la testa), E3: Formación de protocormos, E4: Desarrollo de rizoides, E5: Formación de hojas.

Fuente: Bermeo y Heras, 2019

En la figura 13, se observa que todos los tratamientos comienzan con un 100% de semillas no germinadas (E0), descendiendo de manera similar hasta los 15 días. Tiempo en el cual comienza un pico ascendente de parte de todos los tratamientos entre aproximadamente un 60-85% de semillas, las cuales empiezan a imbibirse (E1) manteniéndose en este porcentaje e incluso en algunos tratamientos aumentando el mismo hasta alcanzar los 75 días, a partir de los cuales se genera un descenso. Esto debido al comienzo de la germinación (E2) existiendo así alrededor de un 35-80% de semillas en esta etapa variando de acuerdo al tratamiento, dentro de los mejores tenemos a *Ilyonectria* (A20, A21, A22), *Epicoccum* (A16), *Umbelopsis* (A12, A19) y *Fusarium* (A15). Pasado los 75 días se observó un porcentaje muy bajo de semillas que generaron protocormos (E3) esta etapa aplica para todos los tratamientos antes mencionados, estos se encontraron por encima del control negativo; sin embargo, cabe destacar que el C+ Phytamax se encuentra por encima de los mismo. Finalmente, el C+ Phytamax fue el único tratamiento que alcanzó las etapas de desarrollo de rizoides (E4) y generó hojas (E5); no obstante, este último dato es muy bajo por lo cual no se observa en la Figura. Lo que tomaría más tiempo el registro de estas semillas para alcanzar porcentajes altos en las etapas E3, E4 y E5.

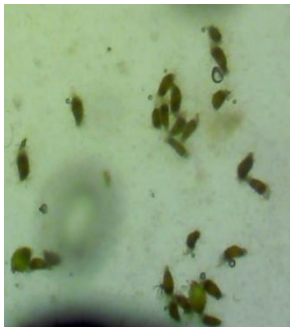
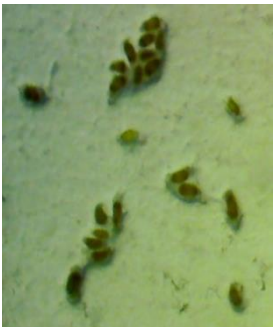

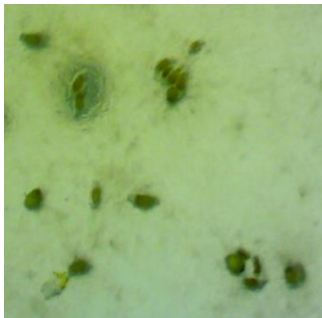

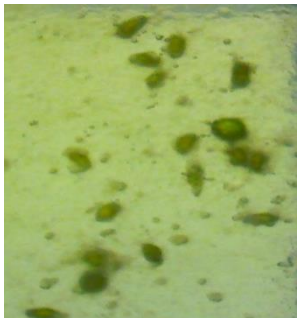
 <p><i>Ilyonectria_A20</i> Etapa 2</p>	 <p><i>Ilyonectria_A22</i> Etapa 2</p>	 <p><i>Ilyonectria_A21</i> Etapa 3</p>
 <p><i>Epicoccum_A16</i> Etapa 3</p>	 <p><i>Umbelopsis_A12</i> Etapa 3</p>	 <p><i>Umbelopsis_A19</i> Etapa 3</p>

Imagen 5. Etapas de germinación alcanzadas en semillas de *E. amethystinoides* en el forófito *O. infrafoveolata*

Fuente: Bermeo y Heras, 2019.



6.8.3 Germinación simbiótica de las semillas de *Elleanthus amethystinoides* correspondiente al forófito *Weinmannia fagaroides* Kunth a los 90 días.

Tabla 11

Porcentaje total de germinación de las semillas de *Elleanthus amethystinoides* correspondientes al forófito *Weinmannia fagaroides* Kunth

Especie orquídea	Especie de árbol	Tratamientos	Total de Semillas	Media de semillas por repetición	% Etapa 0	% Etapa 1 (Imbibición)	% Etapa 2 (Germinación)	% Etapa 3 (Formación de protocormo)	% Etapa 4 (Desarrollo de rizoides)	% Etapa 5 (Formación de hojas)	Total % de germinación
<i>Elleanthus amethystinoides</i>	<i>Weinmannia fagaroides</i> Kunth	<i>Fusarium</i> (E1)	726	103.7	0.1±0.1	21.96±4.94	72.8±6.11	5.14±3.27	0±0	0±0	77.94±4.96
		<i>Fusarium</i> (E2)	706	100.9	0.31±0.2	42.42±13.71	55.9±13.47	1.37±0.56	0±0	0±0	57.27±13.69
		<i>Mucor</i> (E3)	917	131.0	0±0	17.95±3.64	78.8±4.55	3.25±1.45	0±0	0±0	82.05±3.64
		<i>Absidia</i> (E4)	710	101.4	1.95±1.95	31.42±6.42	64.82±7.94	1.82±0.7	0±0	0±0	66.63±7.35
		<i>Sistotrema</i> (E5)	665	95.0	0±0	25.08±4.22	68.57±5.33	6.36±2.61	0±0	0±0	74.92±4.22
		<i>Absidia</i> (E6)	711	101.6	0±0	19.85±7.23	64.04±12.68	1.83±0.92	0±0	0±0	65.86±12.72
		<i>Fusarium</i> (E7)	900	128.6	0±0	29.74±4.53	66.05±5.4	4.21±1.89	0±0	0±0	70.26±4.53
		<i>Meyerozyma</i> (P3)	921	131.6	0.62±0.62	24.27±4.87	67.04±4.69	8.06±4.21	0±0	0±0	75.1±4.54
		<i>Mucor</i> (P4)	742	106.0	0±0	18.59±5.4	76.54±5.64	4.87±1.84	0±0	0±0	81.41±5.4
		<i>Mucor</i> (P5)	735	105.0	0±0	28.62±9.13	67.39±9.62	3.99±0.78	0±0	0±0	71.38±9.13
		Control negativo	740	105.7	0.74±0.49	50.02±8.9	45.07±9.71	0.17±0.14	0±0	0±0	45.24±9.65
		Control positivo	755	107.9	0±0	32.95±6.28	50.6±10.02	13.06±7.38	2.48±2.48	0.62±0.62	66.77±6.45

Fuente: Bermeo y Heras, 2019.

Porcentaje medio acumulativo de la germinación de semillas de *Elleanthus amethystinoides* para los tratamientos fúngicos y controles a los 90 días. Considerando a la E2=ruptura de la testa como inicio de la germinación. Los datos se expresan en medias ± error estándar.

En la tabla 11, se observan los distintos tratamientos simbióticos y los controles utilizados en el ensayo de germinación de las semillas de *E. amethystinoides* para el forófito *W. fagaroides*. Los datos en porcentajes se expresan en medias \pm error estándar para las distintas etapas de crecimiento de las semillas, las cuales nos permitieron evaluar el porcentaje total expresado en medias de la germinación, considerada como la etapa 2, la cual consiste en la ruptura total de la testa. Como se observa el mayor porcentaje de germinación por encima del C+ (Phytamax) lo obtuvieron los tratamientos *Mucor* (E3, P4), *Fusarium* (E1), *Meyerozyma* (P3) y *Sistotrema* (E5), lo que sugiere un posible efecto simbiótico promotor de la germinación de semillas en esta especie de orquídea.

6.8.4 Germinación de las semillas de *Elleanthus amethystinoides* correspondiente al forófito *Weinmannia fagaroides* Kunth.

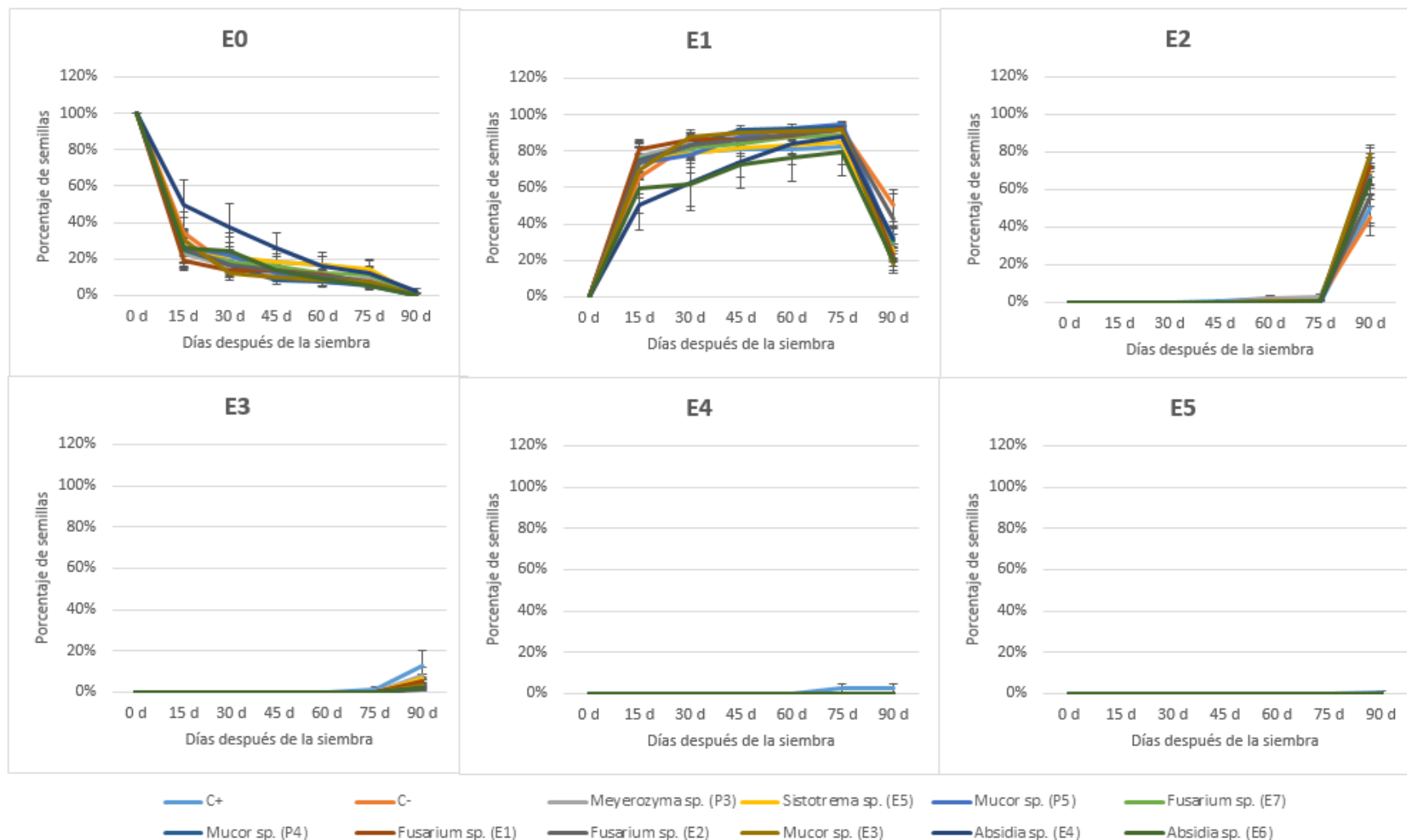


Figura 14. Comportamiento de las semillas de *Elleanthus amethystinoides* a los 90 días, correspondiente al forófito *Weinmannia fagaroides* Kunth, durante las etapas de germinación E0: Semillas no germinadas, E1: Imbibición, E2: Germinación (ruptura de la testa), E3: Formación de protocormos, E4: Desarrollo de rizoides, E5: Formación de hojas.

Fuente: Bermeo y Heras, 2019.



En la figura 14, se observa que todos los tratamientos comienzan con un 100% de semillas no germinadas (E0), descendiendo hasta los 15 días de manera similar con excepción del tratamiento *Absidia* (E4) que presentó un menor número de semillas. Posterior a estos, comenzaron ascender entre un 40-85% de las semillas, imbibándose (E1) de manera continua (con excepción de los tratamientos *Absidia* (E4, E6) los cuales presentaron un menor porcentaje de semillas) hasta los 75 días donde se observa que las semillas comenzaron a germinar (E2) incluyendo el control negativo; sin embargo, este en menor porcentaje y por debajo de todos los tratamientos. A partir de los 75 días se observó la formación de protocormos (E3) de ciertos tratamientos incluyendo al control positivo Phytamax, los cuales presentaron porcentajes muy bajos en E3 destacándose así las cepas *Meyerozyma* (P3), *Sistotrema* (E5), *Fusarium* (E1, E7) y *Mucor* (P4). Sin embargo, luego de 75 días se observó que solo las semillas del control positivo Phytamax desarrollaron rizoides (E4) y generaron hojas (E5) aunque en la figura no se observe ya que fueron porcentajes muy bajos, lo que sugiere realizar por más tiempo el seguimiento de estas semillas para observar las etapas E3, E4 y E5 en altos porcentajes.

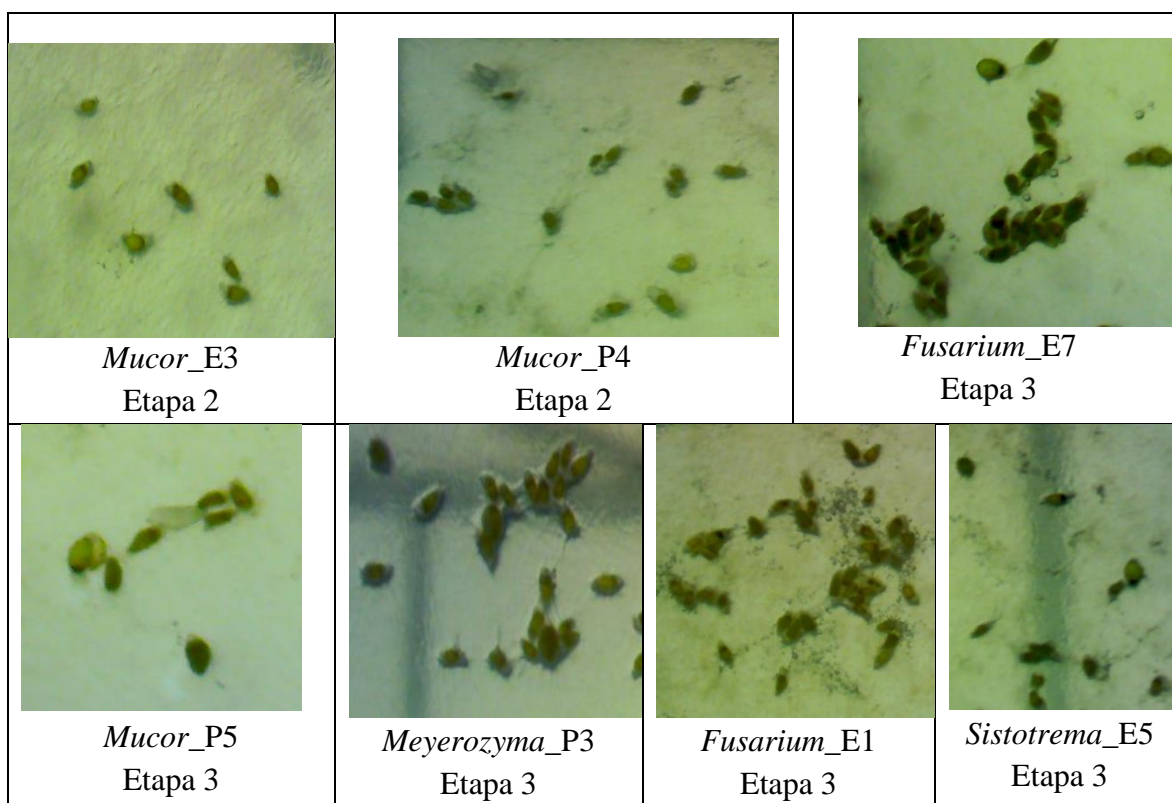


Imagen 6. Etapas de germinación alcanzados en semillas de *E. amethystinoides* en el forófito *W. fagaroides*.

Fuente: Bermeo y Heras, 2019.



CAPITULO VII: DISCUSIÓN

Riqueza de las comunidades de hongos endófitos

Las orquídeas epífitas al igual que las terrestres tienen patrones diferentes en cuanto a su relación con hongos, estas variaciones pueden darse porque cada grupo tienen necesidades diferentes fisiológicamente hablando y a lo largo de su ciclo de vida (Zettler, 2014), así como cada individuo actúa de forma independiente, pueden verse afectados también por factores abióticos como temperatura, lluvia, radiación solar (Khan Academy.org, 2019), e incluso el nivel al que se encuentre la orquídea en el forófito, lo que concuerda con lo encontrado en esta investigación, pues la riqueza de *C. gyriferum* no presenta una influencia directa de los forófitos ni de sus habitats en la formación de la microbiota de sus raíces. No se muestra una especificidad o dependencia en la relación forófito-hospedero-endófito en *C. gyriferum*, tal como indica Maldonado, (2017) quien evaluó hongos endófitos aislados de tres sustratos, roca (sustrato inerte) y dos forófitos *W. fagaroides* y *Ocotea sp*, identificando ciertas cepas del mismo género en los tres sustratos, por lo que este estudio sugiere que en ciertos casos la riqueza de una comunidad de endófitos no está directamente relacionada con el forófito en el que se desarrollan las orquídeas epífitas *C. gyriferum*, a diferencia de los resultados en la especie *E. amethystiniodes* los que sugieren una relación entre el forófito y la orquídea; no obstante, las características del habitat también podrían estar jugando un papel importante, sin embargo este fue un factor que no se consideró en el presente estudio, por lo que no se cuenta con datos concluyentes al respecto, pudiendo ser el forófito, al hábitat o una combinación de ambos factores que afecten la composición de la microbiota endófito-fúngica en las raíces de estas especies. Además, algo que podría explicar las diferencias en las comunidades de endófitos de cada muestra evaluada, es el potencial que tienen los hongos



para colonizar, establecerse e incluso inhibir el desarrollo de otros endófitos (Lizarazo, Mendoza y Gutiérrez, 2014), lo que sugiere que el orden de colonización de los hongos podría influir en la composición de la comunidad fúngica. La riqueza endofítica de las raíces se podría ver afectada por mecanismos inducidos por ciertos hongos mediante la producción de fitoalexinas como el orquinol, para de esta forma evitar que más hongos endófitos colonicen los mismos tejidos (Schulz 2006).

Caracterización molecular de hongos endófitos

Los hongos endófitos han sido objeto de estudio en varias especies de orquídeas, como *Cattleya percivaliana* y *Cattleya trianaei* donde se identificaron los géneros *Fusarium* y *Trichoderma* que se encontraban en las raíces y hojas de estas especies (Lizarazo et al., 2014), lo que sugiere que éstos hongos endófitos también identificados en éste estudio se encuentran colonizando las raíces de otros géneros de orquídeas, cumpliendo distintas funciones como promotores de germinación en semillas de sus hospederos, como reporta Maldonado (2017) con cepas de *Ilyonectria* en *Pleurothallis coricardia*. Además, ciertos hongos reportados en el presente estudio como *Trichoderma*, *Xylaria*, *Epicoccum*, *Sistotrema*, *Fusarium*, *Ilyonectria* y *Umbelopsis* coinciden con géneros aislados por Maldonado (2017) en *Pleurothallis coriacardia* donde se pudieron identificar cepas de *Trichoderma*, *Fusarium*, *Ilyonectria*, *Absidia*, *Epicoccum*, *Umbelopsis* y *Xylaria* en el bosque de Mazán, un área cercana a la zona de estudio. Por otra parte, Salazar (2017) evaluó la riqueza de hongos endófitos en orquídeas epífitas en los bosques Llaviuco y Mazán reportando la presencia de *Meyerozyma guilliermondii* y *Fusarium* como endófitos de orquídeas epífitas resultados que coinciden con esta investigación.

Hongos endófitos promotores de la germinación de C. gyriferum y E. amethystinoides

Hongos endófitos de Ocotea infrafoveolata

En éste estudio se reportan algunas cepas que presentaron efectos promotores de la germinación permitiendo un desarrollo similar al del control positivo, tal es el caso de *Umbelopsis* que es un género de hongo no micorrízico endófito de orquídeas (Ji-Chuan Kang, et al., 2015), perteneciente a la subdivisión Mucoromycotina que ha mostrado tener propiedades oleaginosas siendo un efectivo productor de lípidos, *Umbelopsis isabellina* ha sido estudiado y se ha demostrado que acumula lípidos en más del 40% de su biomasa debido a sus altos niveles de acumulación de triacilglicéridos intracelulares (Takeda, et al., 2014). Harrison; Harrison y Arditti; Manning y Van Staden (como se citó Zettler, et al., 2003) mencionan que los hongos suministran azúcares simples necesarios para el metabolismo temprano de los protocormos, es decir, la utilización de las reservas de lípidos; además el estudio de Gebauer, G y Meyer, M (2013) nos indica que al aislar *Umbelopsis nana* de *Cymbidium* presentó un efecto vigoroso en el desarrollo de *Cymbidium hybridum*, mejorando los contenidos de K, Ca, Cu, Mn en las plántulas simbióticas. Esto se puede corroborar con nuestro estudio ya que *Umbelopsis* mostró un efecto fitoestimulante durante el desarrollo de las semillas de *C. gyriferum* obteniendo así que las cepas A10 y A4 llegaran a la etapa 5, es decir, a formar la primera hoja y con la cepa A24 las semillas alcanzaron la etapa 4 correspondiente a la presencia de rizoides. En *E. amethystinoides* las cepas A12 y A19 alcanzaron la formación de protocormos (etapa 3) a los 90 días.



Maldonado (2017) encontró que en la orquídea *Pleurothallis coriacardia* los aislados de la cepa *Ilyonectria* generaron ciertas estructuras y envolvimiento de las semillas con su micelio, teniendo un efecto promotor en el desarrollo de las mismas. En nuestro ensayo realizado con *E. amethystinoides* también obtuvimos un efecto promotor de la germinación en las primeras etapas llegando hasta la formación de protocormos en un reducido número de semillas a los 90 días a pesar de que existen pruebas de que *Ilyonectria* es un patógeno causante de la enfermedad del pie negro de los árboles leñosos (Cabral, et al., 2011; Jankowiak, et al., 2016), esto contrasta con el efecto benéfico que podría tener en las orquídeas.

Domsch et al (como se citó en García, et al., 2006) menciona que *Epicoccum* es un hongo encontrado frecuentemente en el ambiente y asociado a los tejidos dañados de las plantas, y que, presenta un mejor crecimiento en medios con altos contenidos de glucosa y sacarosa. Según Martínez, 2019 *Epicoccum* produce una variedad de sustancias usadas en medicina e industria, además de fungicidas, bactericidas y antioxidantes, es también un estimulante del crecimiento en cultivos de caña de azúcar, no obstante, Martínez, 2019 menciona también que algunas cepas de este hongo pueden ser patógenas. A pesar de que, hasta la fecha, el género *Epicoccum* no ha sido reportado como hongo endófito en orquídeas, nuestros resultados registran la presencia de este hongo en raíces de *Elleanthus amethystinoides* y además presentamos evidencia de un efecto promotor de la germinación en semillas de *Elleanthus amethystinoides*. La presencia de este hongo se puede explicar ya que es un hongo subcosmopolita (Martínez, 2019) asociándose a diferentes tipos de tejidos vegetales. Además, se reporta como hongo endófito de plantas medicinales (Ramírez, Delgado, Rodolfi y Solveig, 2006).



Ordoñez (2012) reveló que *Trichoderma* fue uno de los hongos endófitos aislados de raíces de vainilla silvestre, y al ser inoculado en *Vanilla planifolia* actuó como estimulador en su crecimiento, además de contribuir a tolerar estrés hídrico y generar protección ante patógenos, también mejoró la disponibilidad de nutrientes del suelo, en nuestra investigación, la cepa *Trichoderma*_A5 aislada de *C. gyriferum* fue un efectivo estimulador en la germinación de sus semillas llegando a una etapa de desarrollo 5, formación de la primera hoja, luego de 90 días de su inoculación en condiciones *in vitro*. De igual forma (Lizarazo et al., 2014) en su estudio en *Cattleya percivaliana* y *Cattleya trianaei* lograron aislar e identificar *Trichoderma* como endófito de sus hojas y raíces. Mientras Maldonado (2017), obtuvo también resultados favorables con una cepa de *Trichoderma* aislada, donde el 50% de semillas de *Pleurothallis coriacardia* alcanzaron las etapas 2 y 3 de desarrollo. Se ha reportado además a *Trichoderma* como productoras de auxinas y ácido giberélico promoviendo altos porcentajes de germinación en *Pleione sp* (Teixeira da Silva, et al 2015).

Hongos endófitos de Weinmannia fagaroides

Fusarium es un género de hongo no micorrízico (Ji-Chuan Kang, et al., 2015), registrado como endófito y patógeno en diferentes tejidos y hospederos, e incluso asociado a las raíces de las orquídeas actuando como un promotor de su crecimiento (Ovando et al. 2005, Tan et al. 2012, Tao et al. 2012). Tal es el caso de la especie *Fusarium semitectum* que según Tsavkelova et al. (2008), induce la formación del protocormo y la germinación de las semillas de *Cypripedium reginae*, de la misma manera, el autor reporta que la especie *Fusarium proliferatum*, aislada de *Dendrobium moschatum* promueve su crecimiento mediante la producción de giberelinas; el género *Fusarium* reportado también como promotor de la germinación en la orquídea *Platanthera* (Vujanovic, St-Arnaud, Barabe y Thibeault, 2000);



así como también en el estudio de Maldonado (2017) donde la cepa *Fusarium* promovió un estado de desarrollo tres equivalente a la ruptura de la testa en semillas de la orquídea *Pleurothallis coriacardia*; además ha sido reportado como productor de auxinas y ácido giberélico en especies de orquídeas del género *Dendrobium*, *Sterostylis* y *Cymbidium*, promoviendo la germinación y desarrollo posterior de sus protocormos (Teixeira da Silva, et al 2015), todos estos estudios nos demuestran que esta cepa, considerada generalmente como patógena, en algunos casos juega un papel beneficioso para las orquídeas. Dentro de nuestra investigación, pudimos confirmar estos efectos fitoestimulantes positivos en la germinación, obteniendo un desarrollo de las semillas de *E. amethystinoides* que alcanzó hasta la etapa tres, equivalentes a la obtención de protocormos, todo ello con la inoculación de las cepas *Fusarium* (E1, E7) que tuvieron resultados similares a los del control positivo; siendo evaluadas en un período de 90 días.

Mucor sp ha sido reportado como un hongo endófito de orquídeas, como *Psychilis kraenzlinii*, *Psychilis krugii* (Bayman y Otero, 2006b), *Pleurothallis*, *Epidendrum* (Cando y Cárdenas, 2017), así como también *Elleanthus oliganthus* y *Trichoceros anteniferum* (Cando y Cárdenas, 2017). Pertenece a la clase Zygomycetes y a la familia Mucoraceae (Arias y Piñeros, 2008). Es un hongo filamentoso que también se lo puede encontrar en el suelo, las plantas, los desechos orgánicos y vegetales (Fundación Bioquímica Argentina. Org, sf). Pese a que esta cepa se encuentra en estudios de aislamiento e identificación en raíces de orquídeas, no ha sido utilizada en ensayos de germinación, por lo cual, no pudimos comparar los efectos favorables que obtuvimos en nuestro estudio en semillas de *E. amethystinoides* al utilizar las cepas *Mucor* (E3, P4) con las cuales las semillas se desarrollaron hasta la etapa 2 equivalente a la germinación y *Mucor* (P5) hasta la etapa 3 donde se formaron protocormos,



esto puede deberse a que *Mucor* al ser un hongo filamentosos posee un cuerpo vegetativo con hifas aseptadas y gruesas que forman el micelio así como esporangios (Instituto Nacional de Salud, 2007), los cuales poseen paredes celulares que están compuestas en el caso del micelio por un complejo de varios polímeros con alta proporción de ácido glucurónico y de manosa, así como glicoproteínas donde el principal compuesto es el azúcar manosa (Lederkremer, 1985), a diferencia de los esporangios que son ricos en proteínas, lípidos, glucanos y melanina (Pereyra, 1999), un ejemplo de la descripción anterior es la cepa *Mucor rouxii*. Pudiendo por ello ocurrir la penetración del hongo en la semilla, en donde las hifas fúngicas se digieren proporcionando una fuente de carbohidratos exógenos al desarrollo de embriones (Kauth, 2005).

Meyerozyma o *Candida* (Pecoraro et al., 2012) es un género de hongo haploide (NCBI, 2019), endófito, perteneciente a la familia *Shaccharomycetaceae*, reportado en el estudio de Salazar (2017) como hongo endófito de las orquídeas *Epidendrum geminiflorum*, *Fronitaria caulescens*, *Stelys* y *Epidendrum fruticosum* que se encuentran en el bosque Llaviuco. Además, ha sido reportado como un eficaz control biológico de enfermedades fúngicas en cultivos en campo y pos cosecha, en contraposición puede transformarse en un microorganismo oportunista, si existe deficiencia nutricional en la planta (Mamani, 2018). Al ser buscada como *Candida*, se la puede encontrar como un hongo endófito de la orquídea terrestre *Orchis tridentata* (Pecoraro, Girlanda, Kull, Perini y Perotto, 2012) o también como un hongo endófito micorrízico en otras orquídeas (Ji-Chuan Kang, et al., 2015). No obstante, no se ha reportado en otros estudios, además de los citados como promotor de la germinación en orquídeas. En nuestro estudio, la cepa identificada como *Meyerozyma* (P3) mostró efectos positivos en la promoción de la germinación de *E. amethystinoides* generando protocormos,



es decir que alcanzó la etapa 3, a los 90 días de la evaluación. Lo cual podría explicarse ya que los hongos suministran azúcares simples necesarios para el metabolismo temprano de los protocormos (Zettler, et al.,2003).

Sistotrema sp es un género de hongo que pertenece a la división de los basidiomicetos (Basidiomycota) los cuales se encuentran asociados dentro de las ectomicorizas (Sánchez de Práger, 2001). Ha sido reportado en orquídeas terrestres tales como *Cypripedium irapeanum*, en un estudio donde se realizó el análisis de la secuenciación de la región ITS de sus raíces, el resultado sugirió que parte del tejido micorrizado se encontraba dominado por Tulasneaceae: *Sistotrema* sp., *Rhizoctonia solani* y *Epulorhiza* sp (Valdés, Bautista, Martínez y Viquez, 2011); otras de las orquídeas donde se ha encontrado esta cepa son *Piperia unalascensis* y *Platanthera obtusata* demostrándose su efecto micorrízico (Bayman, Paul y Otero, Joel. (2006b), de la misma manera en el estudio de Durán, Rivero y Seemann (2007) en la orquídea *Gavilea araucana* encontraron la posible presencia del género *Sistotrema* sp, no obstante, la determinación de la misma se realizaría a futuro con pruebas moleculares. Por otro lado, en el estudio realizado por Baeza, Medel y Garibay (2017) mencionan que dentro de los morfotipos de las comunidades de hongos micorrízicos se encontraba la especie *Sistotrema confluens*, el mismo que favorece la sobrevivencia de plántulas ya que tiene la capacidad para adaptarse a las condiciones ambientales. Sin embargo, esta cepa no se ha utilizado en ensayos de germinación que demuestren que tenga efectos fitoestimulantes. En nuestro ensayo, *Sistotrema* mostró tener efecto estimulante positivo en la germinación de semillas de *E. amethystinoides* ya que alcanzaron la etapa 3 equivalente a la formación de protocormos a los 90 días de la inoculación con la cepa *Sistotrema* (E5).



En nuestro estudio observamos que el control negativo (medio avena agar) de la orquídea *Elleanthus amethystinoides* también llegó a germinar, resultado obtenido tanto para el forófito *Ocotea infrafoveolata* como para *Weinmannia fagaroides*, esto se puede explicar por la hidratación que tuvieron las semillas en el medio, es probable que sean muy eficientes absorbiendo agua, lo que llevo a que se imbiban produciendo que rompan la testa, sin embargo no se tuvieron resultados en las siguientes etapas, mantienendose siempre con valores por debajo de los demás tratamientos, hecho que coincide con lo mencionado por (Abdelnour-Esquivel & Vincent Escalant, 1994) quien encontró como posible estimulador de la germinación de las orquídeas al medio de cultivo, el mismo que puede variar de acuerdo a la especie en estudio, debido a que los requerimientos de las semillas pueden ser muy diversos, incluso en especies del mismo género (Mayo, Cázares, de la Cruz & Flores, 2010). El medio de avena agar o agar de harina de avena (OMA) es utilizado en ensayos de germinación “in vitro” sin embargo los efectos que este puede producir por las diferentes concentraciones de avena no han sido investigados (Otero Ospina & Bayman, 2009; Salazar-Mercado, 2012) por lo cual no se puede concluir con que este sea un influyente directo en la germinación, sin embargo, pese a la falta de investigaciones antes mencionadas, existen estudios en los cuales se ha encontrado que el medio avena agar posee efectos estimuladores en la germinación, tal es el caso en orquídeas como *Dendrobium lindleyise* en donde las altas concentraciones de avena podrían potenciar la germinación de sus semillas (Mala, Kuegkong, Sa-ngiaemsri & Nontachaiyapoom, 2017) así como también en las orquídeas del género *Epidendrum* en el estudio de Bermeo y Sari (2018), quienes obtuvieron un desarrollo de las semillas hasta el estadio 2 con avena agar, pudiendo inferir que los requerimientos de



los diferentes componentes para la germinación varían según la especie de orquídea que se trate (Mayo et. al, 2010).

CAPITULO VIII: CONCLUSIONES

1. Al realizar el análisis de riqueza de las comunidades de hongos endófitos aislados de *Cyrtocillium gyriferum*, se evidencia que la composición de su microbiota no está directamente relacionada con el forófito sobre el que crecen ya sea *Ocotea infraveolata* o *Weinmannia fagaroides*. Se asume que cada planta actúa como un individuo independiente, pues no se mostraron patrones de similitud en su riqueza; esto indica que la microbiota de estas orquídeas se forma de acuerdo a las necesidades fisiológicas de esta especie y que el principal rol del forófito es el de sostén para la orquídea.
2. El análisis de riqueza de *Elleanthus amethystinoides*, sugiere que el forófito tiene una relación directa con la microbiota fúngica que se forma en las raíces de la orquídea, demostrando la importancia del forófito, pues se presume que brinda condiciones favorables para que exista la presentan de estos microorganismos y a su vez estos puedan asociarse fácilmente con la orquídea. Sin embargo, también se



evidenció un efecto que podría estar asociado al sitio de colecta. Nuestros datos no permiten definir claramente cual es el factor más influyente, sin embargo, nuestros datos apoyan la hipótesis de que el forófito es determinante en la riqueza de la comunidad fúngica.

3. Además se podría mencionar que las orquídeas al atrapar hojarasca, desechos orgánicos como excremento de insectos y otros animales, sumado a su interacción con los microorganismos generan mejores condiciones para que otras plantas como enredaderas crezcan con mayor facilidad (Proyecto GM México, 2013) y así poder tener mayor diversidad en el árbol, lo que permite mayor captación de agua ayudando así al ciclo hidrológico (Duncan Gromko, 2013) también las orquídeas atraen insectos polinizadores que a su vez pueden ser benéficos para los cultivos cercanos a las zonas agrícolas aledañas (GM México, 2013).
4. Se lograron aislar e identificar molecularmente cepas cultivables puras de hongos endófitos de las raíces de *C. gyriferum* y *E. amethystinoides*, obteniendo resultados a nivel de género con 36 cepas en total, de las cuales 18 pertenecen a *C. Gyriferum* y 18 a *E. amethystinoides*, de estas *Umbelopsis*, *Ilyionectria* y *Fusarium* fueron comunes en ambas orquídeas. Además, solo un porcentaje de estas demostraron actuar como endófitas fitoestimulantes. De cada género que se identificó existieron varias cepas con la misma identidad como *Umbelopsis*, *Fusarium*, *Mucor*, e *Ilyionectria*, pero que al ser evaluadas como posibles estimulantes en la germinación resultaron tener efectos diferentes.
5. Las cepas *Umbelopsis* (A4, A10, A24) y *Trichoderma*_A5 son eficaces como estimulantes en la germinación de semillas de *C. gyriferum*, pero únicamente en *O.*



infraveolata, llegando a formar rizoides e incluso la primera hoja, nivel alcanzado también con el control en Phytamax. Mientras que las cepas evaluadas para *E. ametistinoides* en el mismo forófito, *Ilyonectria*, (A20, A21, A22), *Umbelopsis* (A12, A19), *Epicoccum*_A16 y *Fusarium*_A15 también obtuvieron resultados significativos que prueban un posible efecto del hongo sobre las semillas, alcanzando la formación de protocormos. En el caso del forófito *W. fagaroides* los endófitos aislados de *C. gyriferum* no tienen efecto alguno sobre la germinación de sus semillas; mientras que las cepas *Mucor* (E3, P4, P5) *Fusarium* (E1, E2, E7), *Meyerozyma*_P3 y *Sistotrema*_E5 aisladas de *E. amethystinoides* en el mismo forófito muestran un efecto promotor de la germinación, en semillas de *E. amethystinoides* llegando a la etapa 3 (protocormos).

6. Los resultados evidenciados en esta investigación muestran un acercamiento hacia tratar de entender las relaciones entre forofito-orquidea-endófito y como estos pueden ser determinantes en la conservación de las especies y la comprensión de sus interacciones en el sistema, hasta ahora poco estudiadas, ya que no solo se debería enfocar a un bosque dentro de un aspecto económico, sino biológico debido a los servicios ambientales que nos brindan.



CAPITULO IX: RECOMENDACIONES

Se recomienda estandarizar la cantidad de microlitros en las muestras para el análisis de riqueza y diversidad del DGGE, ya que de esta forma se pueden obtener resultados comparables para el índice de diversidad.

Realizar el ensayo de germinación durante más tiempo para evidenciar de mejor manera la acción de los endófitos, ya que algunas cepas pueden tener acción tardía o un efecto más lento que otras.

Tener el mismo número de muestras colectadas en todas las zonas de estudio, pues al tener un número variado se limitó la posibilidad de definir con claridad si la mayor influencia está dada por especie de forófito o por características propias de la zona de colecta.

Durante nuestra investigación hemos logrado identificar cepas de hongos que se encuentran en las raíces de orquídeas que poseen características que pueden ser beneficiosos para otros cultivos ya que posiblemente influyan en su desarrollo, así como ser una herramienta para el control biológico. Por lo que se sugiere que estos se podrían ser estudiados con otras plantas para probar su posible efecto.

BIBLIOGRAFÍA

Abdelnour-Esquivel, A. & Vincent Escalant, J. (1994). Conceptos Básicos Del Cultivo de Tejidos Vegetales.

Agricultureros.com. (24 de octubre de 2018). Los “probióticos del suelo” prometen cultivos más grandes y más sanos, pero hay un inconveniente. Red de Especialistas en Agricultura.

Recuperado de <http://agricultureros.com/los-probioticos-del-suelo-prometen-cultivos-mas-grandes-y-mas-sanos-pero-hay-un-inconveniente/>

Aiteco.com (Martes, 23 de junio de 2011). Diagrama de Dispersión: Relación entre Variables.

Coefficiente de Correlación. *Aiteco consultores*. Recuperado de

<https://www.aiteco.com/diagrama-de-dispersion/#targetText=El%20diagrama%20de%20dispersi%C3%B3n%20es,visualizar%20e%20interpretar%20los%20datos.>

Alghamdi, S. A. (2017). Influence of mycorrhizal fungi on seed germination and growth in terrestrial and epiphytic orchids. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Recuperado de

<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.10.021>

Ambiente.gob.ec. (2013, Noviembre 18). Parque Nacional Cajas. Recuperado 12 de noviembre

de 2018, de <http://www.ambiente.gob.ec/parque-nacional-cajas/>

Angel CA, Tsubota A, Leguizamón J, Cárdenas M, Cháves C, Cadena G, Bustillo A. (2001).

Enfermedades y plagas en Cattleyas; antecedentes e investigaciones en Colombia.

Chinchiná (Colombia): CENICAFE. p. 322.



- Arditti, J. (1992). Fundamentos de la biología de las orquídeas. Fundamentals of orchid biology. New York, John Wiley & Sons. 691 p
- Arias, E. L y Piñeros, P.A. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz verde. Pontificia Universidad Javeriana-Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. Trabajo de grado. Recuperado de <https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis226.pdf>
- Baeza, Y.G., Medel, R.O y Garibay, R.O. (2017). Caracterización morfológica y genética de los hongos ectomicorrízicos asociados a bosques de *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional Cofre de Perote, Veracruz. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, volumen 88 (1). 41-48. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.01.027>. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1870345317300271>
- Bayman, P., y Otero, J. T. (2006). Microbial Endophytes of Orchid Roots, En: B. Schulz, C. Boyle, T.N. Sieber (Eds), *Soil Biology* (pp. 153-177), Verlag Berlin Heidelberg. Springer.
- Bayman, Paul y Otero, Joel. (2006b). Endophytic Fungi in Roots of Terrestrial, Photosynthetic Orchids. The Microbial Endophytes of Orchid Roots. 10.1007/3-540-33526-9_9. *Soil Biology, Volume 9*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/225994710_Microbial_Endophytes_of_Orchid_Roots
- Bermeo, C. y Sari, F. (2018). *Simbiosis Hongo – Micorriza como factor promotor de la germinación en semillas de orquídeas del género Epidendrum* (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/30479/1/Trabajo%20de%20Titulaci%C3%B3n.pdf>



- Bertolini1, V., Damon, A., y Rojas, A. (2014). Quelato de hierro y agua de coco en la germinación in vitro de *Rossioglossum grande* (Orchidaceae). *Acta Agronómica*, Vol. (63), Núm.3, pp.1. Recuperado de https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/rt/printerFriendly/42735/48393
- Bonfante, P., y Anca, I.-A. (2009). Plantas, hongos micorrícicos y bacterias: una red de interacciones . *Scopus*, 363-383.
- Bonnardeaux, Y., Brundrett, M., Batty, A., Dixon, K., Koch, J., y Sivasithamparam, K. (2007). Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. *Mycological Research*, 111(1), 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.11.006>
- Brundrett, M. C. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, 154(2), 275-304. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00397.x>
- Cabral, A., Groenewald, J. Z., Rego, C., Oliveira, H., y Crous, P. W. (2012). *Cylindrocarpon* root rot : multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radiculicola* species complex. *Mycol Progress* 11:655–688. <https://doi.org/10.1007/s11557-011-0777-7>
- Cando, M y Cárdenas M. (). *Determinación mediante aislamiento y purificación de hongos potencialmente micorrízicos en las raíces de seis especies de orquídeas en el cantón Gualaceo, provincia del Azuay*. (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26368/1/Tesis.pdf>



- Currah, R. S. (1987). *Thanatephorus pennatus* sp nov. isolated from mycorrhizal roots of *Calypso bulbosa* (Orchidaceae) from Alberta. *Canadian Journal of Botany*, 65(9), 1957–1960.
- De Bary A. (1879). Die Erscheinung der Symbiose. In: K.J. Trübner (ed.) *Vortrag auf der Versammlung der Naturforscher und Aerzte zu Cassel*. (pp. 21-22)
- Dighton, J. (2009). *Encyclopedia of Microbiology*. New Lisbon.
- Dressler, Robert. (1981). Chapter 3 Structure - Seedlings. The Orchids Natural History and Classification. 10.2307/1219717. Pág 73
- Dressler, R. (1993). *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. Portland: Dioscorides Press.
- Domsch, K., Gams, W., y Anderson, T. (1993). *Compendium of Soil Fungi*. Second edition. Academic Press; 1993;1-2:700.
- Duncan Gromko. (2013). Agua y Diversidad. Recuperado de <https://blogs.iadb.org/agua/es/agua-biodiversidad/>
- Durán, C., Rivero, M., y Seemann, P. (2007). Identificación de endomicorrizas en la orquídea nativa *Gavilea araucana* (Phil.) Correa. *Agro Sur* 35 (2): 67-69. Recuperado de <http://revistas.uach.cl/html/agrosur/v35n2/body/art32.htm> o <http://revistas.uach.cl/index.php/agrosur/article/view/3957>
- Endara, L., Hirtz, A., y Jost, L. (2011a). *Elleanthus amethystinoides*. En León-Yáñez, S., R. Valencia, N. Pitman, L. Endara, C. Ulloa Ulloa & H. Navarrete (eds.). 2011. Libro rojo de plantas endémicas del Ecuador: 2ª edición. Publicaciones de Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. Recuperado de



<https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/FichaEspecie/Elleanthus%20amethystinoides> ,
acceso Domingo, 26 de Agosto de 2018.

Endara, L., Hirtz, A., y Jost, L. (2011b). *Cyrtochilum gyriferum*. En León-Yáñez, S., R.

Valencia, N. Pitman, L. Endara, C. Ulloa Ulloa & H. Navarrete (eds.). 2011. Libro rojo
de plantas endémicas del Ecuador: 2^a edición. Publicaciones de Herbario QCA, Pontificia
Universidad Católica del Ecuador, Quito. Recuperado de

<https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/FichaEspecie/Cyrtochilum%20gyriferum>, acceso
Domingo, 26 de Agosto de 2018.

Endara, L. y Jost, L. (2011a). *Orchidaceae: La Diversidad, Ecología y Estado de Conservación*.

En León-Yáñez, S., R. Valencia, N. Pitman, L. Endara, C. Ulloa Ulloa & H. Navarrete
(Eds.). Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador, 2^{da} edición (pp.441). Quito,
Ecuador. Recuperado de

<https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/ListaEspeciesPorFamilia/500330>

Endara, L. y Jost, L. (2011b). *Orchidaceae: La Diversidad, Ecología y Estado de Conservación*.

En León-Yáñez, S., R. Valencia, N. Pitman, L. Endara, C. Ulloa Ulloa & H. Navarrete
(Eds.). Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador, 2^{da} edición (pp.442). Quito,
Ecuador. Recuperado de

<https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/ListaEspeciesPorFamilia/500330>

FCNYM (sf). Índice de diversidad. Estimación de la diversidad específica. Recuperado de

<https://www.fcnym.unlp.edu.ar/catedras/ecocomunidades/TPN3Diversidad.pdf>



Fernández Suárez¹, M y Le Borgne, S (s.f). DGGE: electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante.pp.149.Recuperado de

<https://micrositios.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/dgge.pdf>

Fischer, Ana Luisa. (2007). Cultivo de Orquídeas, volumen 1. Buenos Aires, Argentina: Grupo Imaginador.

Freuler, Maria Julia. (2008). "De flores exóticas y cosmopolitas." In Orquídeas, edited by Cecilia Repetti, 7-10. Editorial Albatros

Fundación Bioquímica Argentina. Org. (sf). Subprograma Micología- Mucor. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209118166002.pdf>

Gamboa-Gaitán, M. a. (2006). Hongos Endófitos Tropicales : Conocimiento actual y perspectivas. Acta Biológica Colombiana, 11(1), 3–20.

Galeas, C., Aguirre, Z., Navarro, G., Ferreira, W., Cornejo, X., Mogollón, H., . . . Toasa, G. (2010). Propuesta Metodológica para la representación cartográfica de los ecosistemas del Ecuador continental.

García, D., Rojas, M y Sánchez, J. (2006). Contenido microbiológico cultivable del tracto intestinal y polen almacenado de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Bogotá-Colombia. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v11n1/v11n1a10.pdf>

Gebauer, G. y Meyer, M. (2013). ¹⁵N and ¹³C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. New Phytol., 2013, 196, 209–223. Recuperado de <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1469-8137.2003.00872.x>



- GM México. (2013). La importancia de las Orquídeas en el Medio Ambiente. Recuperado de <http://proyectogmmexico.blogspot.com/2013/02/la-importancia-de-las-orquideas-en-el-d.html>
- Harling, G. (1999). Flora of Ecuador, Cunoniaceae No 61. Departament of Systematic Botany, Göteborg University, Sweden. (pp. 74).
- Heredia, C., Alarcón, A., Hernández, L., Ferrera, R., y Almaraz, J. (2014). Diversidad, ecología e importancia potencial de los hongos endófitos septados oscuros en México. *Botanical Science*, 92(3), 321-333. Recuperado de 23 de junio de 2019, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-42982014000300001&lng=es&tlng=es.
- Hernández, JI. (2000). Patrones de distribución de las epifitas vasculares y arquitectura de los forofitos de un bosque húmedo tropical del Alto Orinoco, Edo. Amazonas, Venezuela. *Acta Biol. Venez* 20(3):41-58. Recuperado de <http://www.ciens.ucv.ve/biologia/documentosLEPE/HernandezRosas2000.pdf>
- Instituto Nacional de Salud. (2007). Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Serie de normas técnicas n.º 44. Sección 5. Lima. INS-CNSP-44.69. Recuperado de <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual%20Hongos.pdf>
- Jankowiak, R., Bilański, P., Paluch, J., y Kołodziej, Z. (2016). Fungi associated with dieback of *Abies alba* seedlings in naturally regenerating forest ecosystems. *Fungal Ecology*, 24, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.08.013>



- Kageyama S.A., Mandyam K.G. y Jumpponen A. 2008. Diversity, function and potential applications of the root-associated endophytes. In: Varma A. Ed. *Mycorrhiza*, 3th ed., pp. 29-57, Springer-Verlag, Germany.
- Kauth, P.J. (2005). In vitro seed germination and seedling development of *Calopogon tuberosus* and *Sacoila lanceolata* var. *lanceolata*: two Florida native terrestrial orchids. MS thesis, Environmental Horticulture Department, University of Florida.
- Knapp D.G., Pintye A. y Kovács G.M. 2012. The dark side is not fastidious - dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. *PLoS ONE*. 7:e32570.
- Khan Academy.org. (2019). *Estructura de la comunidad*. Recuperado de <https://es.khanacademy.org/science/biology/ecology/community-structure-and-diversity/a/community-structure>
- Lederkremer, Gerardo Zelmar. (1985). Biosíntesis de glicoproteínas en *Mucor Rouxii* : Metilación in vivo de residuos de manosa en oligosacáridos con unión N-glicosídica a asparagina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Recuperado de nos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1923_Lederkremer.pdf
- Lizarazo, P., Mendoza, M., Gutiérrez, A. (2014). Diversidad de la micobiota endófito de *Cattleya percivaliana*. *Actualidades Biológicas*, 37 (102), 307-311. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/6760/1/52518492.2012.pdf>
- Ma, Xiaoya y Kang., Ji-Chuan y Nontachaiyapoom, Sureeporn y Wen, Ting-Chi y Hyde, Kevin. (2015). Non-mycorrhizal endophytic fungi from orchids. *Current Science*. 109. pp.72-87. (pp.44) Recuperado de



https://www.researchgate.net/profile/Ji_Chuan_Kang/publication/281653882_Non-mycorrhizal_endophytic_fungi_from_orchids/links/56a1c65c08ae24f62702144e.pdf

Mala, B., Kuegkong, K., Sa-ngiaemsri, N. & Nontachaiyapoom, S. (2017). Effect of germination media on in vitro symbiotic seed germination of three Dendrobium orchids. South African Journal of Botany, 112, 521-526.

Maldonado, G. (2017). *Caracterización de la comunidad de hongos endófitos asociados a la raíz de Pleurothallis coriacardia y evaluación de su efecto en el desarrollo de sus semillas* (tesis de maestría). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador

Mamani, M (2018). Estrategias bioquímicas para la producción de compuestos con actividad biológica inhibitoria del crecimiento de fitopatógenos que afectan a cultivos del mango en la región de La Plazuela, Irupana. UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS. La Paz. (Tesis de maestría). La Paz, Bolivia. Recuperado de <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/17589/TM-1929.pdf?sequence=1>

Mariat, F., 1952. Recherches sur la physiologie des embryons des orchide'es (Re-search on the physiology of embryos of Orchises). Rev. Gén. Bot. 59, 324–377 (inFrench)

Martínez, I. (18 de enero del 2019). *Epicoccum nigrum*. Recuperado de <http://tubiologia.forosactivos.net/t13931-epicoccum-nigrum>

Mas, E., Poza, J., Ciriza, J., Zaragoza, P., Osta, R., y Rodellar, C. (2001). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Revista AcuaTIC*, (15). Recuperado de <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/html/art1501/basespcr.htm>



- Mayo, A., Cázares, J., de la Cruz, E., & Flores, A. (2010). Germinación in vitro de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco. *Revista de Ciencias de la Vida* (Vol. 20).
- Minga, D y Verdugo, A. (2016). Árboles y Arbustos de los Ríos de Cuenca. Árboles Nativos: *Weinmannia fagaroides* Kunth. (pp. 38). Serie Textos Apoyo a la Docencia Universidad del Azuay. Imprenta Don Bosco. Cuenca. Azuay-Ecuador. Recuperado de <https://biologia.uazuay.edu.ec/sites/default/files/public/Arboles%20y%20Arbustos%20de%20los%20r%C3%ADos%20de%20Cuenca.pdf>
- Menchaca, R.A. (2011). Manual para la propagación de orquídeas. Recuperado de http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/documentos/MANUAL_PARA_LA_PROPAGACION_DE_ORQUIDEAS.PDF
- Myers R.M., T. Maniatis y L.S. Lerman. (1987). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel-electrophoresis. *Methods in Enzymology* 155: 501-527.
- NCBI- National Center for Biotechnology Information.(2019). *Meyerozyma guilliermondii*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=Meyerozyma+guilliermondii%5BOrganism%5D&cmd=DetailsSearch>
- Ordoñez, N. (2012). *Efecto de hongos endófitos de orquídeas del grupo Rhizoctonia y otros endófitos cultivables sobre el desarrollo de plantas de Vanilla planifolia* Jacks (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Medellín, Colombia.
- Otero, J. T., Ackerman, J. D., y Bayman, P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89(11), 1852–1858. <http://doi.org/10.3732/ajb.89.11.1852>



- Otero, J. T., y Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epífitas. pp:271. Recuperado de https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/12519/13119
- Ovando I, Damon A, Bello R, Ambrosio D, Albores V, Adriano L, Salvador M. 2005. Isolation of endophytic fungi and their mycorrhizal potential for the tropical epiphytic orchids *Cattleya skinneri*, *C. aurantiaca* and *Brassavola nodosa*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 4 (3): 309-315.
- Pangol, C., y Tapay, W. (2017). *Evaluación de epífitas en árboles hospederos dentro de bosques andinos en la provincia del Azuay* (tesis obtención de título). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/28147/1/TESIS.pdf>
- Pecoraro, L., Girlanda, M., Kull, T., Perini, C., & Perotto, S. (2012). Analysis of fungal diversity in *Orchis tridentata* Scopoli. *Open Life Sciences*, 7(5). <http://doi.org/10.2478/s11535-012-0071-y>
- Pecoraro, Lorenzo & Girlanda, Mariangela & Kull, Tiiu & Perini, C & Perotto, Silvia. (2012). Analysis of fungal diversity in *Orchis tridentata* Scopoli. *Central European Journal of Biology*. 7. 10.2478/s11535-012-0071-y. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/257907835_Analysis_of_fungal_diversity_in_Orchis_tridentata_Scopoli
- Pereyra, Elba Nora. (1999). Morfogénesis y cAMP en el hongo *Mucor rouxii*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. pp27. Recuperado de https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n3105_Pereyra.pdf o http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3105_Pereyra.pdf



Plants.jstor.org. (s.f). Paratype of *Ocotea infrafoveolata* van der Werff [family Lauraceae] on JSTOR. Recuperado 11 de noviembre de 2018, de

<https://plants.jstor.org/stable/10.5555/al.ap.specimen.qcne30413>

Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el Índice de Shannon y la riqueza. Venezuela. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Vol. 31, núm. 8, agosto, pp. 583-590. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/339/33911906.pdf>

Ramírez, J., Delgado, E., Rodolfi, M., y Solveig, T. (2006). Actividad antagónica de hongos endófitos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas. *Boletín Micológico*, (21), 49 – 53. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/239929153_ACTIVIDAD_ANTAGONICA_D_E_HONGOS_ENDOFITOS_DE_PLANTAS_MEDICINALES_DEL_ECUADOR SOBRE_BACTERIAS_PATOGENAS

Rasmussen, H. (1995). *Orquídeas terrestres de semilla a planta micotrófica*. Cambridge: Cambridge University Press.

Salazar, S.A. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo in vitro de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae). Universidad Francisco de Paula Santander. San José de Cúcuta, Colombia. *Scielo*. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v61n1/v61n1a09.pdf>

Salazar, M. (2017). *Estudio comparativo de la riqueza de hongos endófitos asociados a la diversidad de orquídeas epífitas en los bosques de Mazán y la zona de influencia del Parque Nacional El Cajas* (tesis de maestría). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.

- Sánchez de Práger, M. (Ed). (2001). Capítulo 11-Micorrizas. En Terranova (Eds). *Agricultura Ecológica. Enciclopedia Agropecuaria*, 2^{da} edición (pp. 197-210). Bogotá, Colombia. Terranova Editores, Ltda.
- Schulz, B. (2006). Mutualistic interactions with fungal root endophytes en: Schulz B, Boyle C y Sieber T, editores. *Microbial root endophytes*. New York: Springer. p. 261-276.
- Seaton, P. T y Ramsay, M. 2005. Growing orchid seed. Royal Botanic Garden, Kew, Londres. 82 p.
- Sternberg, M.L., Kane, M.E. (1998). In vitro seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, an endangered Florida orchid. *Lindleyana* 13, 101–112.
- Stewart, S.L., Zettler, L.W., 2002. Symbiotic germination of three semi-aquatic reinorchids (*Habenaria repens*, *H. quinqueseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquatic Botany* 72, 25–35
- Strassburg, Deshmukh, S. K., Prakash, V., y Ranjan, N. (2017). Recent advances in the discovery of bioactive metabolites from *Pestalotiopsis*. *Phytochemistry Reviews*, 1-38.
- Swarts, N. D., Sinclair, E. A., Francis, A., & Dixon, K. W. (2010). Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid. *Molecular Ecology*, 19(15), 3226-3242. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04736.x>
- Takeda, I., Tamano, K., Yamane, N., Ishii, T., Miura, A., Umemura, M.,...Machida, M. (2014). Genome Sequence of the Mucoromycotina Fungus *Umbelopsis isabellina*, an Effective Producer of Lipids. *Genome announcements –NCBI*, 2(1). doi: 10.1128/genomeA.00071-14. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3937604/>



- Tan XM, Chen XM, Wang CL, Jin XH, Cui JL, Chen J, Guo SX, Zhao LF. 2012. Isolation and identification of endophytic fungi in roots of nine *Holcoglossum* plants (Orchidaceae) collected from Yunnan, Guangxi, and Hainan provinces of China. *Current Microbiology*, 64 (2): 140-147.
- Tao G, Liu Z, Sun B, Zhu Y, Cai L, Liu X. 2012. Occurrence and diversity of endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae) in Guizhou, China. *African Journal of Microbiology Research*, 6 (12): 2859-2868.
- Tao, G., Liu, Z., Hyde, K., Lui, X., y Yu, Z. (2008). Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchideaceae). *Fungal Divers*
- Teixeira, J.A., Tsavkelova, E.A., Zeng, S., Ng, T. B., Parthibhan, S., Dobránszki, J., ... y Rao, M. V. (2015). Symbiotic in vitro seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. *Planta*, 242(1), 1-22.
<https://doi.org/10.1007/s00425-015-2301-9>
- Tropicos.org (s. f.). Nombre - *Ocotea infrafoveolata* van der Werff. Recuperado 9 de noviembre de 2018, de <http://www.tropicos.org/Name/17805586?projectid=2>
- Tsavkelova EA, Bömkea C, Netrusov AI, Weiner J, Tudzynski B. (2008). Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain. *Fungal Genetics and Biology*, 45 (10): 1393-1403.
- Unterseher M, Schnittler M. 2010. Species richness analysis and ITS rDNA phylogeny revealed the majority of cultivable foliar endophytes from beech (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecology*, 3 (4): 366-378.



- Valdés, M., Bautista, H., Martínez, L., Viquez, R. (2011). The root colonizing fungi of the terrestrial orchid *Cypripedium irapeanum*. *Lankesteriana*, volumen 11(1). 15-21.doi: 10.15517/LANK.V11I1.18311. Recuperado de <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/lankesteriana/article/view/18311/18500>
- Vasudevan, R & VanStaden, J (2010). In vitro asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. *Scientia Horticulturae* 23. 496-506. South Africa. Recuperado de <https://vdocuments.mx/in-vitro-asymbiotic-seed-germination-and-seedling-growth-of-ansellia-africana.html>
- Vujanovic, V., St-Arnaud, M., Barabe, D. y Thibeault, G. (2000). Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Ann. Bot.*, 86(1), 79–86.
- Waterman, R.J., & Bidartondo, M.I. (2008). Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids. *Journal of Experimental Botany*, 59(5), 1085–1096. Recuperado de <http://doi.org/10.1093/jxb/erm366>
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: M.A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, y T. J. White. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. (pp. 315-322) New York, Academic Press, Inc.
- Xiaoya, M., Kang, J., Nontachaiyapoom, S., Wen, T. y, & Hyde, K. D. (2015). Nonmycorrhizal endophytic fungi from orchids. *Current Science*, 108, 1–16.
- Zettler, L. (1997). Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: Techniques and Perspectives. *Selbyana*. 18(2):188-194.



Zettler, L., Sharma, J., y Rasmussen, N. (2003) Mycorrhizal diversity En: K. Dicon, S.P.

Kell, R.L. Barrett, P.J. Cribb. *Orchid Conservation*. (pp. 205-226). Kota Kinabalu, Sabah. Natural History Publications.

Zettler, L.W., Sharma, J., y Rasmussen, F.N. (2003). Chapter 11- Mycorrhizal Diversity-Orchid-fungus relationships in germination and development, Distribution. En K.W. Dixon, S.P. Kell, R.L. Barrett and P.J. Cribb (eds) 2003, *Orchid Conservation*. (pp.206). Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah.

ANEXOS

Anexo 1. Tabla con todos los nombres de las cepas de hongos enviados a Macrogen.

Especie de árbol	Nombre (Genero)	Codificación de laboratorio	ORQUIDEA
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>		A1	Elleanthus
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Hypoxylon	A2	Elleanthus
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>		A3	Cyrtochillium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Umbelopsis	A4	Cyrtochillium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Trichoderma	A5	Cyrtochillium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>		A6	Cyrtochillium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Umbelopsis	A7	Cyrtochillium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Umbelopsis	A8	Cyrtochillium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Umbelopsis	A9	Cyrtochillium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Umbelopsis	A10	Cyrtochillium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>		A11	Cyrtochilium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Umbelopsis	A12	Elleanthus
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>		A13	Elleanthus
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>		A14	Elleanthus
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Fusarium	A15	Elleanthus
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Epicoccum	A16	Elleanthus
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>		A17	Elleanthus
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>		A18	Elleanthus
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Umbelopsis	A19	Elleanthus
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Ilyonectria	A20	Elleanthus
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Ilyonectria	A21	Elleanthus
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Ilyonectria	A22	Elleanthus



<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Fusarium	A23	Cyrtochillium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Umbelopsis	A24	Cyrtochillium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Umbelopsis	A25	Cyrtochillium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Fusarium	A26	Cyrtochillium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Fusarium	A27	Cyrtochillium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Umbelopsis	A28	Cyrtochillium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>		A29	Cyrtochillium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Armillaria	A30	Cyrtochillium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>	Candida	A31	Cyrtochillium
<i>Ocotea infrafoveolata van der Werff</i>		A32	Cyrtochillium
<i>Weinmannia fagaroides Kunth</i>	Fusarium	C1	Cyrtochillium
<i>Weinmannia fagaroides Kunth</i>	Fusarium	C2	Cyrtochillium
<i>Weinmannia fagaroides Kunth</i>	Absidia	C3	Cyrtochillium
<i>Weinmannia fagaroides Kunth</i>	Umbelopsis	C5	Cyrtochillium
<i>Weinmannia fagaroides Kunth</i>	Fusarium	C6	Cyrtochillium
<i>Weinmannia fagaroides Kunth</i>	Fusarium	E1	Elleanthus
<i>Weinmannia fagaroides Kunth</i>	Fusarium	E2	Elleanthus
<i>Weinmannia fagaroides Kunth</i>	Mucor	E3	Elleanthus
<i>Weinmannia fagaroides Kunth</i>	Absidia	E4	Elleanthus
<i>Weinmannia fagaroides Kunth</i>	Sistotrema	E5	Elleanthus
<i>Weinmannia fagaroides Kunth</i>	Absidia	E6	Elleanthus
<i>Weinmannia fagaroides Kunth</i>	Fusarium	E7	Elleanthus
<i>Weinmannia fagaroides Kunth</i>		P2	Elleanthus
<i>Weinmannia fagaroides Kunth</i>	Meyerozyma	P3	Elleanthus
<i>Weinmannia fagaroides Kunth</i>	Mucor	P4	Elleanthus
<i>Weinmannia fagaroides Kunth</i>	Mucor	P5	Elleanthus

Anexo 2. Muestras de raíces congeladas a -80°C , recolectadas de los distintos bosques



Imagen 7. Muestras de raíces congeladas a -80°C .



Imagen 8. Muestras de raíces para pruebas moleculares.

Anexo 3. Extracción de ADN de raíces



Imagen 9. Desinfección de raíces.



Imagen 10. Kit de extracción de ADN para raíces.



Imagen 11. Extracción de ADN de raíces.



Imagen 12. ADN de raíces.

Anexo 4. Aislamiento de cepas puras

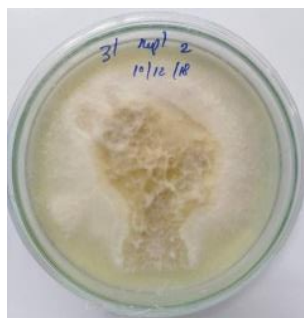


Imagen 13. Cepas aisladas de *Cyrtochilum gyriferum* forófito *Ocotea infrafoveolata*.



Imagen 14. Cepas aisladas de *Elleanthus amethystinoides* forófito *Ocotea infrafoveolata*.



Imagen 15. Cepas aisladas de *Cyrtochilum gyriferum* forófito *Weinmannia fagaroides*



Imagen 16. Cepas aisladas de *Elleanthus amethystinoides* forófito *Weinmannia fagaroides*.

Anexo 5. Extracción de ADN de hongos

Imagen 17. ADN extraído.

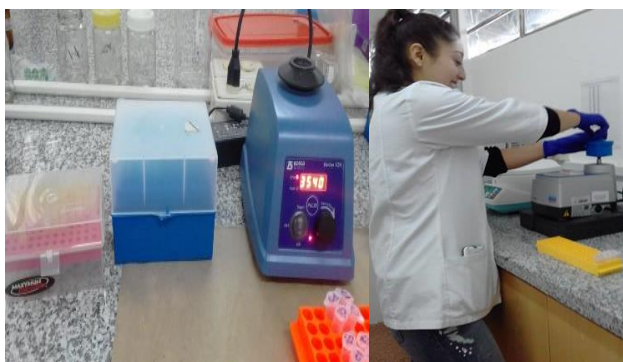


Imagen 18. Kit de extracción de ADN de hongos.

Anexo 6. Semillas de las orquídeas *Cyrtochilum gyriferum* y *Elleanthus amethystinoides*.Imagen 19. Semillas de *Cyrtochilum gyriferum*Imagen 22. Semillas de *Elleanthus amethystinoides*

Anexo 7. Prueba de Tetrazolio

Imagen 25. Semillas teñidas con Tetrazolio.

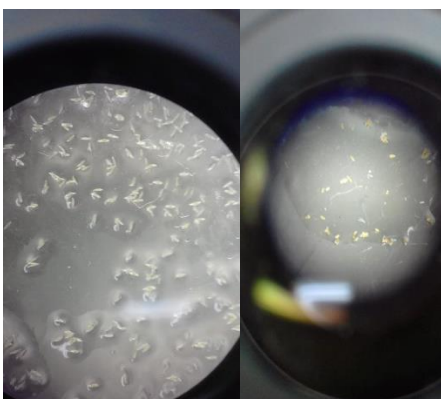


Imagen 26. Observación de semillas teñidas.

Anexo 8. Pruebas preliminares de desinfección de las semillas

Imagen 27. Cloro preparado al 1% y 2%

Imagen 28. Semillas en Phytamax, Avena Agar, al 1% y 2% de cloro
Imagen 29. Cloro preparado al 1% y 2%

Imagen 30. Semillas en Phytamax, Avena Agar, al 1% y 2% de cloro

Anexo 9. Ensayo de germinación.



Imagen 33. Medios de cultivo para la siembra.



Imagen 34. Materiales de siembra

Imagen 35. Ensayo final de las orquídeas
Imagen 36. Materiales de siembra

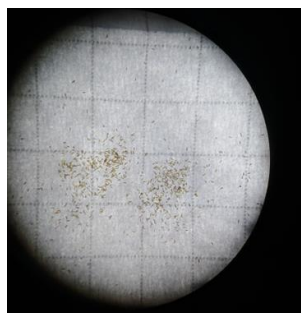


Imagen 37. Conteo de semillas de *C. gyriferum* y *E. amethystinoides*

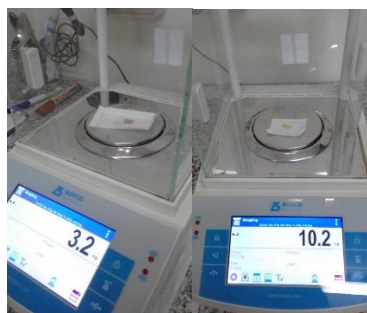


Imagen 38. Cantidad de semillas por siembra de orquídea.



Imagen 39. Dispensión de medios más UV.



Imagen 40. Ensayo final de las orquídeas

Imagen 41. Preparación de alícuotas para PCR. Imagen 42. Ensayo final de las orquídeas

Anexo 10. Realización de PCR

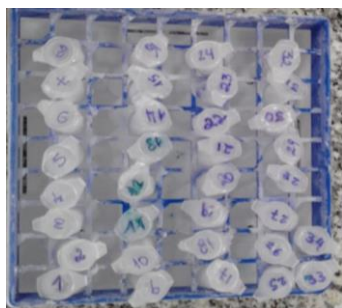


Imagen 43. ADN de raíces.

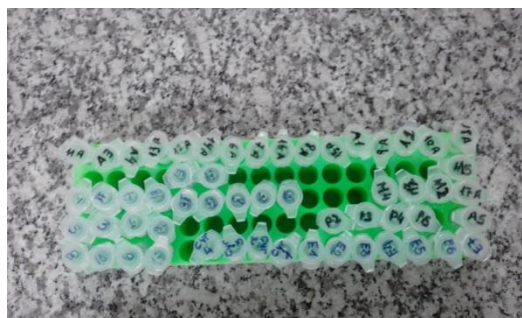
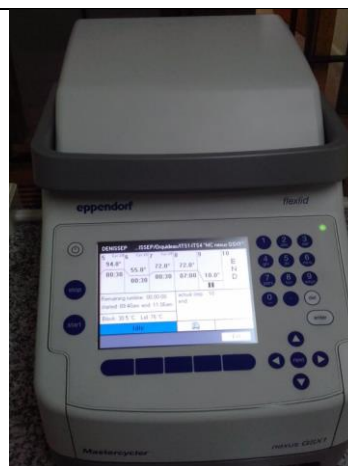
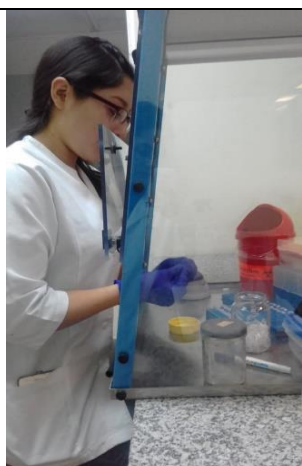

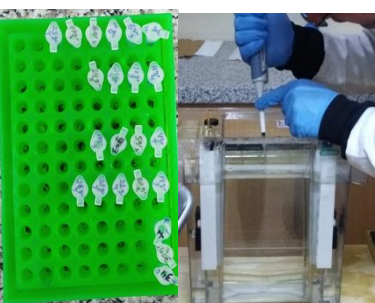
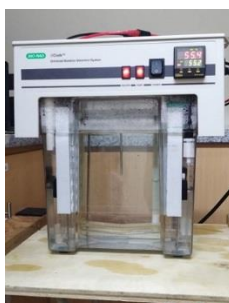


Imagen 44. ADN de hongos.



<p>Imagen 45. Preparación de alícuotas para PCR.</p>	<p>Imagen 48. Muestras para PCR en termociclador.</p>
 <p>Imagen 49. Preparación de gel para cargar las muestras de PCR simples o anidadas.</p>	 <p>Imagen 50. Corrida del gel para observar las bandas.</p>

Anexo 11. Prueba de DGGE

 <p>Imagen 51. Geles con gradiente desnaturizante.</p> <p>Imagen 52. Bandas de ADN de hongos</p> <p>Imagen 53. Geles con gradiente desnaturizante.</p>	 <p>Imagen 54. Carga de muestras de PCR anidadas en el gel.</p>	 <p>Imagen 55. Corrida del gel por 17 horas.</p>
---	--	---

Anexo 12. PCR de hongos y raíces

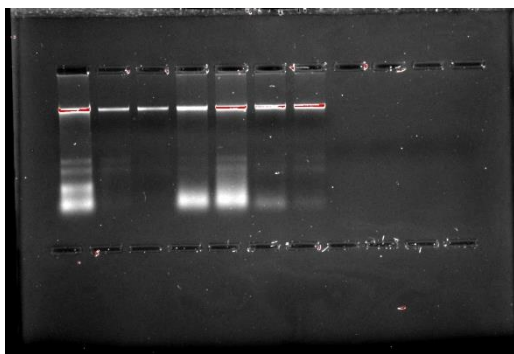


Imagen 56. Bandas de ADN de hongos

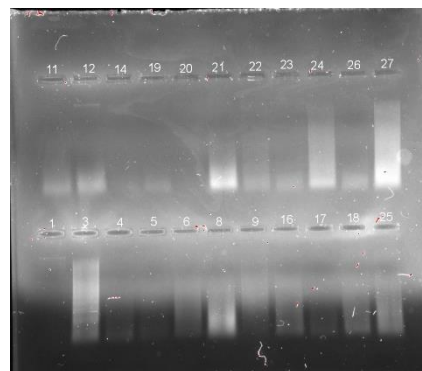


Imagen 59. Bandas de ADN de raíces.

Imagen 60. Bandas de ADN de raíces.